

NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG
BETA-ADRENERGER REZEPTOREN
AN HERZMUSKEL- UND LUNGENGeweBE
VON MEERSCHWEINCHEN

Monika WEINSTEIGER

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548325_0019

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG BETA-ADRENERGER REZEPTOREN
AN HERZMUSKEL- UND LUNGENGeweBE VON MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Monika Weinsteiniger
aus München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. E. Erdmann. . .

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1981.



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Erläuterung des Rezeptorbegriffes	1
1.2 Alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren	3
1.3 Biochemischer Nachweis der Adrenoceptoren	10
1.4 Das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System	20
1.5 Bedeutung des Betarezeptor-Adenylat- zyklase-Systems für verschiedene Erkrankungen und für die Betablocker- therapie	26
1.6 Ziel dieser Arbeit	29
2. MATERIAL UND METHODIK	31
2.1 Material	31
2.2 Methoden zur Herstellung von Membran- suspensionen	32
2.2.1 Membranpräparation nach Alexander et al.	33
2.2.2 Membranpräparation unter Verwendung eines Dextran-Polyäthylenglykol- Zweiphasensystems	34
2.2.3 Membranpräparationen, modifiziert nach Drummond und Severson	37
2.3 Bindungsexperimente mit radioaktiv markierten beta-adrenergen Antagonisten	39
2.3.1 Messung der Assoziationsreaktion	40
2.3.2 Messung der Dissoziationsreaktion	40
2.3.3 Konzentrationsabhängige Bindung	41
2.4 Versuchsanordnung und Durchführung der Filtrationsmethode zur Isolierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes	42
2.5 Durchführung der Messung der Adenylat- zyklaseaktivität	43
3. EXPERIMENTELLE BEFUNDE UND DEREN BESPRECHUNG	46
3.1 Untersuchungen zur Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung	46
3.1.1 Darstellung unspezifischer Bindungsstellen	46
3.1.2 Stereospezifität als Kriterium zur Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung	49

3.2	Spezifische Bindungsstellen für (-)- ³ H-Dihydroalprenolol und deren Stabilität an verschiedenen Membranpräparationen . . .	56
3.3	Kinetische Bindungsexperimente	61
3.3.1	Assoziationsreaktion	61
3.3.2	Dissoziationsreaktion	66
3.3.3	Untersuchungen über beta-adrenerge Rezeptorinteraktionen	66
3.4	Bindungsexperimente im Äquilibrium	74
3.4.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten für beta-adrenerge Antagonisten und der Anzahl beta-adrenerge Rezeptoren durch Auftragung nach Scatchard	74
3.4.2	Hemmung der Bindung eines markierten beta-adrenergen Antagonisten durch unmarkierte Agonisten und Antagonisten	81
3.5	Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Adenylatzyklaseaktivität	97
3.5.1	Stereospezifische Hemmung der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklaseaktivität durch Antagonisten	97
3.5.2	Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität der Adenylatzyklase und auf die Bindung beta-adrenerger Substanzen an den Rezeptor	101
4.	DISKUSSION	105
5.	ZUSAMMENFASSUNG	121
6.	LITERATURVERZEICHNIS	126
	LEBENS LAUF	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMP	=	Adenosinmonophosphat
ATP	=	Adosintriphosphat
CAMP	=	zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
D/PEG	=	Dextran-Polyäthylenglykol
DTT	=	Dithiothreitol
EGTA	=	Titriplex IV
GDP	=	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	=	Guanosin-5'-monophosphat
Gpp(NH)p	=	5'-Guanylyl-imidodiphosphat
GTP	=	Guanosin-5'-triphosphat
³ H-CAMP	=	zyklisches ³ H-Adenosin-3'-5'-monophosphat- ammoniumsalz
(-)- ³ H-DHA	=	(-)- ³ H-Dihydroalprenolol
³ H-HBI	=	³ H-Hydroxybenzylisoprenalin
ITP	=	Inosin-5'-triphosphat
¹²⁵ J-HYP	=	¹²⁵ J-Hydroxybenzylpindolol
³² P-ATP	=	³² P-Adenosin-5'-triphosphat-triäthylammonium- salz
Upm	=	Umdrehungen pro Minute
XTP	=	Xanthin-5'-triphosphat

1. EINLEITUNG

1.1 Erläuterung des Rezeptorbegriffes

Die Vorstellung, daß Pharmaka mit Rezeptoren reagieren, geht auf Langley (91) und P. Ehrlich (51) zurück. Die Beobachtung, daß bestimmte Pharmaka bereits in geringer Konzentration einen biologischen Effekt auslösen, während hiervon manchmal nur gering strukturdifferente Substanzen erst in sehr viel höherer Konzentration einen vergleichbaren oder keinen Effekt verursachen, veranlaßte Paul Ehrlich (51) zu der Hypothese, daß sich Pharmaka, die bereits in geringer Konzentration wirksam sind, mit spezifischen zelleigenen Molekülen (Rezeptoren) verbinden müßten, um zur Wirkung zu gelangen, und er prägte den bekannten Satz: "Corpora non agunt nisi fixata."

Da für die Wirkung derartiger Substanzen eine molekulare Komplementarität zu ihrem primären Wirkort (Rezeptor) gefordert werden muß, bezeichnet man diese Pharmaka als strukturspezifisch (82). Gemeinsame Strukturmerkmale von verschiedenen Pharmaka sind dabei für die gleichartige biologische Wirkung verantwortlich. Dementsprechend kann eine leichte Veränderung ihrer chemischen Struktur die pharmakologische Wirkung erheblich beeinflussen bis hin zu einem antagonistischen Verhalten.

Durch die Einführung von radioaktiv markierten strukturspezifischen Pharmaka konnte in den letzten Jahren der direkte biochemische Nachweis solcher spezifischen zelleigenen Bindungsproteine erbracht werden (41, 61, 63, 100, 149). Wir verstehen heute unter einem Hormon- oder Pharmakonrezeptor ein meist aus Aminosäuren aufgebautes Makromolekül, welches mit hoher Affinität und Selektivität ganz bestimmte Hormone und Pharmaka bindet. Der gebildete Hormon- bzw. Pharmakonrezeptorkomplex löst nach möglicherweise erfolgter Konformationsänderung des Bindungsproteins (102) die weiteren Schritte der Hormon- oder Pharmakonwirkung aus. Dieser Definition entsprechende Rezeptoren wurden sowohl im Cytoplasma von Zellen z.B. für

Steroidhormone (14) als auch in der Zellmembran (43) nachgewiesen, z.B. für Insulin (40, 57), für Histamin (134, 143), für TSH (127), für somatotropes Hormon (103), für Acetylcholin (79), für ACTH (56, 100), für Glucagon (13), für Catecholamine und Betarezeptorenblocker (84, 95, 97, 120), für Herzglykoside (5, 52) und für Opiate (136, 165), um nur einige zu nennen.

Das Rezeptormolekül im engeren Sinn wird nicht nur durch seine molekulare Komplementarität zum strukturspezifischen Pharmakon charakterisiert, sondern darüber hinaus durch die infolge dieser Bindung hervorgerufene biologische Antwort (70). Die genaue biochemische Reaktionsfolge zur Auslösung einer biologischen Antwort in der Zelle nach Bindung des Pharmakons oder Hormons an den Rezeptor ist noch weitgehend unklar. Bekannt ist, daß Rezeptoren an bestimmte Enzyme gekoppelt, wie z.B. der beta-adrenerge Rezeptor an die Adenylatzyklase (122, 162, 163) oder sogar Teil derselben sein können, wie z.B. der Ouabain-Rezeptor als Teil der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (54, 55). Eine Rezeptorbesetzung mit einem Hormon oder Pharmakon löst dementsprechend eine Aktivitätsänderung des Enzyms aus (162), die dann eine intrazelluläre Reaktionskette zur Folge hat. Isoprenalin z.B. wird vom beta-adrenergen Rezeptor gebunden; dadurch wird die Adenylatzyklase stimuliert, und das als "second messenger" intrazellulär gebildete cAMP (zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat) aktiviert bestimmte Proteinkinasen, die dann den meßbaren Effekt bewirken, z.B. Lipolyse in der Fettzelle (26, 96, 97, 120, 163). Die Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der Wirkung beta-adrenerger Agonisten bzw. Antagonisten.

Aufgrund des gestellten Themas wird im weiteren nur das beta-adrenerge Rezeptorsystem näher beschrieben.

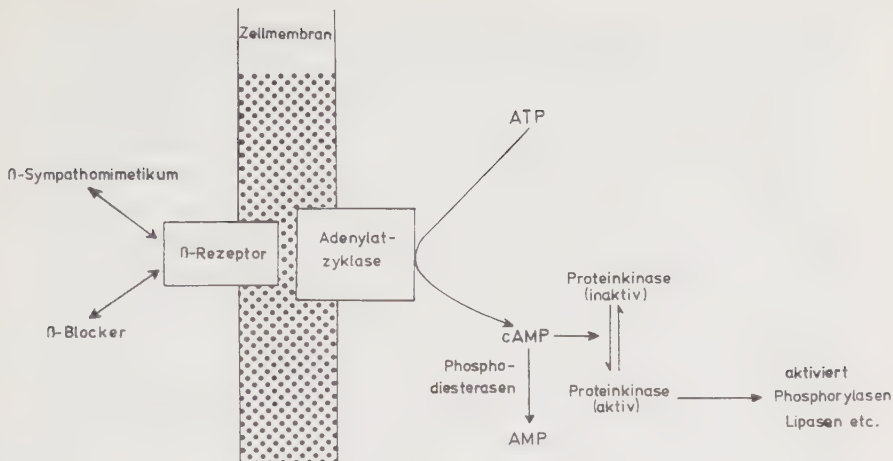


Abb. 1

Schematische Darstellung der Wirkung beta-adrenerger Agonisten bzw. Antagonisten

1.2 Alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren

Die wichtigsten physiologischen Catecholamine sind Noradrenalin, das vorwiegend an den postganglionären Nervenendigungen des Sympathikus freigesetzt wird, und Adrenalin, das hauptsächlich vom Nebennierenmark sezerniert wird (88). Der primäre Wirkort der Catecholamine sind adrenerge Rezeptoren, wobei bereits Dale (45) zwei Typen unterschieden hat. Die heute gebräuchliche Einteilung in alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren stammt von Ahlquist (3). Er prüfte die Reaktion einzelner Organe gegenüber sechs nahe miteinander verwandten sympathomimetischen Aminen. Für die Konstriktion der glatten Muskulatur der Gefäße, des Uterus, der Nickhaut, des Ureters und des Musculus dilatator pupillae ergab sich eine charakteristische Reihenfolge der Wirksamkeit dieser Amine, die Ahlquist einer Erregung von Alpharezeptoren zurechnete. Adrenalin löste dabei den stärksten Effekt aus, Noradrenalin war ebenso

oder allenfalls geringfügig schwächer wirksam als Adrenalin, und Isoprenalin zeigte nur einen schwachen Effekt. Die Reihenfolge der Wirkstärke der getesteten Catecholamine war nahezu umgekehrt, wenn physiologische Effekte wie Vasodilatation, Erschlaffung der Bronchial- und Uterusmuskulatur und die positiv inotrope bzw. chronotrope Wirkung am Herzen gemessen wurden. Diese Effekte werden nach der Definition von Ahlquist durch Betarezeptoren vermittelt. Isoprenalin war dabei am stärksten wirksam, und Adrenalin und Noradrenalin zeigten einen deutlich geringeren Effekt. Wie aus diesen Versuchen bereits vermutet werden kann und wie sich im weiteren Verlauf durch pharmakologische und biochemische Untersuchungen bestätigte, sind grundsätzlich alle Catecholamine zur Alpha- und Betarezeptorstimulation fähig: Allerdings ist die Wirkstärke oder die Affinität der einzelnen Substanzen zum Rezeptor jeweils sehr unterschiedlich (105, 108, 131, 181) (siehe Abb. 2). So ist Phenylephrin, das nicht zu den von Ahlquist getesteten klassischen Catecholaminen gehört, ein starker alpha-adrenerger Agonist mit einer nur sehr geringen Wirksamkeit am beta-adrenergen Rezeptor (96). Für pharmakologische Untersuchungen am Betarezeptor eignet sich besonders Isoprenalin, das die stärkste Wirkung in bezug auf Betarezeptoren-vermittelte Effekte aufweist, den Alpharezeptor jedoch kaum stimuliert. Adrenalin hat sowohl alpha- als auch betamimetische Eigenschaften, so daß sich seine Wirkungen aus zwei pharmakologisch unterscheidbaren Komponenten zusammensetzen (131).

Durch die Anwendung bzw. Entwicklung selektiver Hemmstoffe am alpha-adrenergen Rezeptor und am beta-adrenergen Rezeptor wurde durch pharmakologische Analysen und später auch durch biochemische Methoden (s.u.) die von Ahlquist vorgeschlagene Einteilung der Adrenoceptoren im wesentlichen bestätigt. Alpharezeptor-blockierende Substanzen, wie die seit Dale bekannten Mutterkornalkaloide und die später synthetisierten Substanzen Tolazolin, Phentolamin, Dibenamin, Phenoxybenzamin und Azapetin (123, 132) blockieren nur die exzitatorischen

Wirkungen adrenerger Reize an der glatten Muskulatur, haben aber auf die inhibitorischen Effekte an der glatten Muskulatur und im Prinzip auf die Herzstimulation keinen Einfluß. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß am Herzen verschiedener Spezies wie Kaninchen (157), Ratten, Meerschweinchen und Katzen (154, 169) ein positiv inotroper Effekt auch durch Stimulierung von Alpharezeptoren und nicht nur über Betarezeptoren ausgelöst werden kann. Der durch Phenylephrin verursachte positiv inotrope Effekt war dabei nur durch Alpha-Antagonisten, wie z.B. Phentolamin, hemmbar. Die Spezifität des Angriffspunktes von Alpha-Antagonisten zeigt sich z.B. darin, daß Dosen von Dibenamin, welche den Blutdruck steigern den Effekt von Noradrenalin aufheben, denjenigen von Vasopressin oder Angiotensin nicht beeinflussen (132).

Der erste spezifische Betarezeptorenblocker war Dichlorisoproterenol (142), eine Substanz, mit der eine isolierte Ausschaltung adrenerger inhibitorischer Effekte an der glatten Muskulatur sowie der adrenergen Herzstimulation möglich war. Dichlorisoproterenol blockiert dabei nur die positiv inotrope Wirkung der Catecholamine, hat aber auf die Zunahme der Kontraktionskraft nach Ouabain, Theophyllin oder Calciumionen keinen Einfluß (128). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl Betarezeptor-blockierender Substanzen entwickelt, wie z.B. Propranolol, Alprenolol, Oxprenolol, Nadolol, Sotalol, Practolol, Acebutolol, Pindolol, Metoprolol, Atenolol und Butoxamin, um nur einige zu nennen. Metoprolol, Atenolol und Practolol hemmen dabei die exzitatorischen Wirkungen am Herzen stärker als die inhibitorischen beta-adrenergen Effekte an der glatten Muskulatur und werden deshalb als "kardioselektiv" bezeichnet (78, 124). Butoxamin scheint an der Lunge (Hemmung der Bronchodilatation) stärker wirksam zu sein als am Herzen (124). Andere Beta-blocker, wie z.B. Propranolol, Pindolol und Alprenolol, zeigen keine bevorzugte Wirkung an den einzelnen Organen.

Das Verhältnis der adrenergen Rezeptoren zueinander ist derzeit noch ungeklärt, und es kann nicht entschieden werden, ob Alpha- und Betarezeptoren unterschiedliche Membranstrukturen

oder verschiedene Konformationszustände desselben Rezeptorproteins darstellen. So vermutete Kunos (86) nach Untersuchungen an isolierten Froschherzen, daß alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren temperaturabhängig ineinander übergehen können. Der positiv inotrope Adrenalineffekt konnte am Froschherzen bei 20-24°C stärker durch Betablocker als durch Alphablocker gehemmt werden; bei 10-14°C war dagegen die antagonistische Wirkung der Alphablocker stärker ausgeprägt. Kunos schloß daraus auf eine Zunahme der Alpharezeptoren auf Kosten der Betarezeptoren bei niedriger Temperatur. Wurden die Froschherzen bei 14°C mit dem irreversiblen Alphablocker Phenoxybenzamin inkubiert, dann konnte anschließend bei 24°C durch Adrenalin kein positiv inotroper Effekt ausgelöst werden. Setzte er das Phenoxybenzamin bei hoher Temperatur ein, dann war anschließend bei niedriger Temperatur der positiv inotrope Adrenalineffekt am Froschherzen nicht blockiert (86, 87). Kunos folgerte, daß Phenoxybenzamin bei niedriger Temperatur den adrenergen Rezeptor in seiner "Alpha-Konformation" irreversibel blockierte, so daß dieser bei Temperaturerhöhung nicht in die "Beta-Konformation" überführt werden könne. Die von Kunos aufgestellte These ist jedoch nicht unwidersprochen geblieben. Benfey (15) kritisierte u.a. die bei den Versuchen verwendete hohe Konzentration von Phenoxybenzamin (7,3 µM), die nach seinen Ergebnissen die Adrenalinwirkung unspezifisch beeinflussen könnte. So konnte er zeigen, daß Phenoxybenzamin bereits in einer Konzentration von 2,9 µM den inotropen Effekt von Adrenalin am Froschherzen hemmte. Darüber hinaus bezweifelte Benfey, ob an Froschherzen überhaupt postsynaptische Alpharezeptoren bei irgendeiner Temperatur existieren würden. Stene-Larsen und Helle (161) konnten ebenfalls keine Alpharezeptoren an Froschherzen dreier verschiedener Spezies nachweisen. Diese aufgeführten Untersuchungen zeigen, daß ein endgültiges Urteil über die mögliche Struktur verschiedener Alpha- und Betarezeptoren nicht gegeben ist. Die biochemische Isolierung entsprechender intakter Rezeptorproteine aus der Zellmembran ist bisher noch nicht gelungen. Nach den gegenwärtigen Erkenntnissen scheint sich eher her-

auszustellen, daß Alpha- und Beta-Adrenoceptoren zwei voneinander unabhängige Rezeptorproteine sind.

Pharmakologische Untersuchungen haben ergeben, daß es zwischen den exzitatorischen (positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen) und inhibitorischen (Erschlaffung glatter Muskulatur) Betarezeptoren Unterschiede in ihrer Aktivierbarkeit durch bestimmte adrenerge Agonisten gibt, obwohl diese Rezeptoren nach dem klassischen Konzept von Ahlquist (3) dem gleichen Rezeptortyp zugeordnet werden. Eine weitere Unterteilung der Betarezeptoren in Beta_1 - und Beta_2 -Rezeptoren erschien deshalb sinnvoll (90). Lands und Mitarbeiter (90) haben die relative Wirkstärke einer Reihe sympathomimetischer Amine auf die Mobilisierung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe von Ratten, auf die Herzstimulation von Kaninchen, auf die Bronchodilatation von Meerschweinchen und auf den Blutdruck von Hunden miteinander verglichen. Adrenalin und Noradrenalin erwiesen sich dabei als gleich effektiv sowohl bezüglich der Lipolyse als auch der Herzstimulation. Isoprenalin war hier 3mal so stark wirksam. Die genannten Effekte werden nach Lands über Beta_1 -Rezeptoren vermittelt, die demnach vorwiegend im Herzen und Fettgewebe vorhanden sind. Bei der Auslösung sowohl der Bronchodilatation als auch der Vasodilatation war dagegen Adrenalin wirksamer als Noradrenalin; Isoprenalin zeigte auch hier den stärksten Effekt und war ca. 100mal wirksamer als Noradrenalin. Werden biologische Antworten durch Catecholamine in der Reihenfolge Isoprenalin >> Adrenalin > Noradrenalin hervorgerufen, dann werden sie nach Lands (90) über Beta_2 -Rezeptoren vermittelt. Für Beta_1 -Rezeptoren gilt folgende Wirkstärke: Isoprenalin > Adrenalin = Noradrenalin.

Eine Aktivierung der Alpharezeptoren verursacht eine Stimulierung glatter Muskelzellen und damit eine Zunahme des Muskeltonus (Abb. 2). Man findet sie außer an der glatten Muskulatur z.B. von Gefäßen und Uterus auch im Drüsengewebe (131). Eine Stimulierung der Beta_1 -Rezeptoren (78) bewirkt am Herzen einen positiv inotropen und chronotropen Effekt, am Fett-

gewebe eine Förderung der Lipolyse mit Erhöhung der freien Fettsäuren, an der Niere die Freisetzung von Renin, am Auge über eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion einen erhöhten Kammerdruck. Beta₁-Rezeptoren hat man außerdem im Gehirn gefunden, wobei jedoch der durch sie vermittelte biologische Effekt noch unbekannt ist (78). Beta₂-Rezeptoren (78) bewirken eine Hemmung der glatten Muskulatur und damit eine Abnahme des Muskeltonus an Gefäßen, Bronchien, Darm und Uterus; außerdem erhöhen sie die Stabilität der Mastzellen und stimulieren im Muskel und in der Leber die Glykogenolyse.

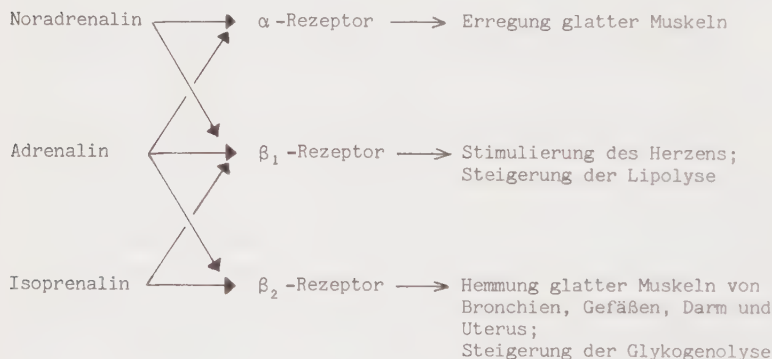


Abb. 2

Wirkung adrenerger Pharmaka auf die verschiedenen Adrenoceptoren

Zuerst glaubte man, daß an einem Organ nur einer der beiden Betarezeptortypen vorhanden sein könnte. Da jeder dieser zwei Betarezeptoren durch seine bestimmte Ansprechbarkeit bzw. Affinität gegenüber den einzelnen beta-adrenergen Substanzen charakterisiert ist, dürften bei Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an den einzelnen Organen verschiedener Spezies für jede getestete Substanz nur maximal zwei verschiedene Kurven möglich sein, je nachdem, ob das betreffende Organ Beta₁- oder Beta₂-Rezeptoren besitzt. Bei derartigen Versuchen (4, 22,

107) zeigten jedoch die einzelnen adrenergen Agonisten und Antagonisten ein weites Spektrum in ihrer Wirksamkeit und Affinität zu den einzelnen Geweben, und die Autoren haben daraus auf eine Vielzahl von verschiedenen beta-adrenergen Rezeptoren geschlossen, wobei jedem Organ ein einziger Rezeptor zugeordnet wurde. Demgegenüber haben Carlsson et al. (31) die Meinung vertreten, daß an einem Organ sowohl Beta_1 , als auch Beta_2 -Rezeptoren vorhanden seien und daß die unterschiedliche pharmakologische Spezifität der jeweiligen Substanzen durch ein wechselndes Verteilungsmuster von Beta_1 - und Beta_2 -Rezeptoren an den einzelnen Organen verursacht werde. In ihren Versuchen konnte diese Arbeitsgruppe zwar am Katzenherzen, nicht jedoch am Rattenherzen sowohl Beta_1 - als auch Beta_2 -Rezeptoren nachweisen. Stene-Larsen und Helle (161) haben an Froschherzen dreier verschiedener Spezies den durch unterschiedliche Catecholamine ausgelösten positiv inotropen und chronotropen Effekt gemessen. Sie fanden dabei eine für den Beta_2 -Rezeptor typische Reihenfolge ihrer Wirksamkeit mit Isoprenalin $\gg$ Adrenalin $\succ$ Salbutamol $>$ Noradrenalin $>$ Phenylephrin $>$ Dopamin und schlossen auf ein Überwiegendes, wenn nicht gar ausschließliches Vorkommen von Beta_2 -Rezeptoren am Froschherzen. Ein weiteres Kriterium dafür ist die Tatsache, daß Salbutamol ein selektiver Beta_2 -Agonist ist, wie Collum et al. (38) bereits nachgewiesen haben, und daß der hier gefundene Betarezeptor eine relativ hohe Affinität gegenüber Salbutamol zeigt.

Heute ist es allgemein anerkannt, daß es prinzipiell keine absolute Organspezifität für eine Betarezeptorart gibt, wobei das Verhältnis Beta_1 -/ Beta_2 -Rezeptor in den einzelnen Organen speziesabhängig variiert (135).

Mit der Verwendung radioaktiv markierter beta-adrenerger Substanzen war in letzter Zeit eine genauere Aufschlüsselung des Verhältnisses Beta_1 -/ Beta_2 -Rezeptoren in den einzelnen Organen möglich geworden (64, 125, 126, 150). Die Bindung immer des gleichen radioaktiv markierten Liganden an die Betarezeptoren wurde durch verschiedene beta_1 - und beta_2 -selektive Agonisten und Antagonisten gehemmt. Aus den daraus ermittelten

Affinitäten der einzelnen unmarkierten adrenergen Substanzen zu den jeweiligen Organen konnte mit Hilfe einer graphischen (150) oder mathematischen (64) oder gemischten (125) Analyse das Verhältnis $\text{Beta}_1/\text{Beta}_2$ -Rezeptoren definiert werden. Danach fand man am Froschherzen 15-25 % Beta_1 -Rezeptoren und 75-85 % Beta_2 -Rezeptoren, wohingegen am Rattenherzen nur Beta_1 -Rezeptoren nachzuweisen waren (64). Rugg und Mitarbeiter (150) fanden an der Rattenlunge 25 % Beta_1 - und 75 % Beta_2 -Rezeptoren; an der Lunge vom Kaninchen war das Verhältnis $\text{Beta}_1/\text{Beta}_2$ -Rezeptoren 60 %/40 %. Minneman et al. (125) analysierten mehrere Organe der Ratte und errechneten folgende $\text{Beta}_1/\text{Beta}_2$ -Verteilung in Prozent: Herz 83/17, Lunge 15/85, Cortex 8/19, Nucleus caudatus 76/24, Cerebellum 15/85, Hippocampus 81/19, Diencephalon 71/29.

Die einzelnen Methoden zur Analyse des Verteilungsmusters $\text{Beta}_1/\text{Beta}_2$ -Rezeptoren haben unterschiedliche Vor- und Nachteile, die kürzlich eingehend diskutiert worden sind (126).

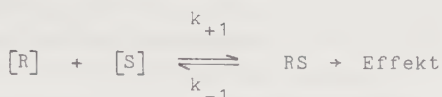
Als Voraussetzung für derartige Messungen der Verteilung $\text{Beta}_1/\text{Beta}_2$ -Rezeptoren an einem Gewebe wird gefordert (126):

1. Es darf nur zwei verschiedene beta-adrenerge Rezeptoren an dem untersuchten Gewebe geben.
2. Die Wechselwirkung der Agonisten und Antagonisten mit dem Betarezeptor muß einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik folgen.
3. Der radioaktive Ligand muß zu beiden Betarezeptoren die gleiche Affinität besitzen.

1.3 Biochemischer Nachweis der Adrenoceptoren

Durch klassische pharmakologische Untersuchungen wurde das Konzept der Alpha-, Beta_1 - und Beta_2 -Rezeptoren entwickelt. In den letzten Jahren gelang mit Hilfe radioaktiv markierter adrenerger Substanzen der direkte biochemische Nachweis und die Quantifizierung derartiger Bindungsproteine in verschiedenen Geweben mehrerer Spezies. Dies wurde möglich durch den Nachweis, daß die Wechselwirkung zwischen dem strukturspezi-

ischen Pharmakon S und seinem Rezeptor R ein reversibler, bimolekularer Prozeß ist, auf den das Massenwirkungsgesetz angewendet werden kann (54, 55, 65).



$[R]$ = molare Rezeptorkonzentration

$[S]$ = molare Pharmakonzentration

$[RS]$ = molare Konzentration des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Anzahl der besetzten Rezeptoren RS hängt einerseits ab von der Konzentration der Rezeptoren und der Substanz und andererseits von den Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} . Durch Umwandlung der oben beschriebenen Gleichung erhält man:

$$\frac{[R] \times [S]}{[RS]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{1}{K}$$

K = Konstante

Nimmt man an, daß 50 % der Rezeptoren mit dem Pharmakon besetzt sind, dann muß die andere Hälfte der Rezeptoren noch frei sein, und es gilt $[R] = [RS]$ und somit:

$$[S] = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{1}{K} = K_D$$

Der Wert K_D gibt demnach diejenige freie Substrat- bzw. Ligandenkonzentration an, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Die Dissoziationskonstante K_D ist ein reziprokes Maß für die Affinität des jeweiligen Pharmakons zu seinem Rezeptor.

Steht nun ein radioaktiv markiertes Pharmakon für die Rezeptorbindungsexperimente zur Verfügung, dann kann der dadurch markierte Rezeptor-Pharmakon-Komplex nach Abtrennung des freien Liganden, z.B. durch Vakuumfiltration, mit Hilfe eines Szintillations- bzw. Gamma-Zählgerätes gemessen werden. Bei derartigen Experimenten wird der radioaktive Ligand in einer sehr niedrigen Konzentration, d.h. unter der Konzentration der Dissoziationskonstante, eingesetzt; der gebundene Anteil des Pharmakons ist daher im Vergleich zur ursprünglich eingesetzten Pharmakonmenge sehr gering.

Die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} können durch zeitabhängige Bindungsexperimente gemessen werden (54). Man bestimmt dabei zu verschiedenen Zeiten den gebildeten Rezeptor-Pharmakon-Komplex. Aus der initialen Reaktionsgeschwindigkeit errechnet sich k_{+1} . Aus dem Kurvenverlauf kann außerdem der Nachweis erbracht werden, daß die Assoziation ein bimolekularer Prozeß ist (54). Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} kann ebenfalls anhand eines kinetischen Bindungsexperimentes gemessen werden. Das radioaktive rezeptorgebundene Pharmakon wird durch eine hohe Konzentration seiner unmarkierten Form aus der Bindung verdrängt. Quantitativ läßt sich diese Konkurrenz um die gleichen Bindungsstellen erfassen, indem man das zu verschiedenen Zeiten noch an den Rezeptor spezifisch gebundene, radioaktive Pharmakon mißt (54). Die sich bei halblogarithmischer Auftragung gegen die Zeit ergebende Gerade beweist, daß die Dissoziation eine Reaktion 1. Ordnung ist. k_{-1} errechnet man dann z.B. nach der Formel:

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t_{\frac{1}{2}}}$$

$t_{\frac{1}{2}}$ = Zeit, nach der noch 50 % des markierten Pharmakons spezifisch gebunden sind.

Aus den durch kinetische Experimente ermittelten Geschwindigkeitskonstanten läßt sich die Dissoziationskonstante für

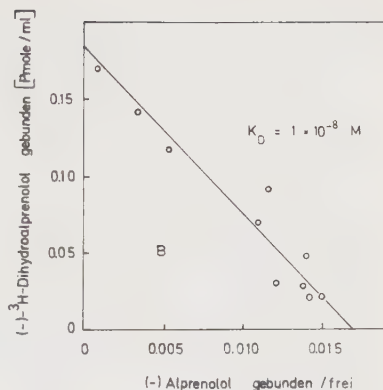
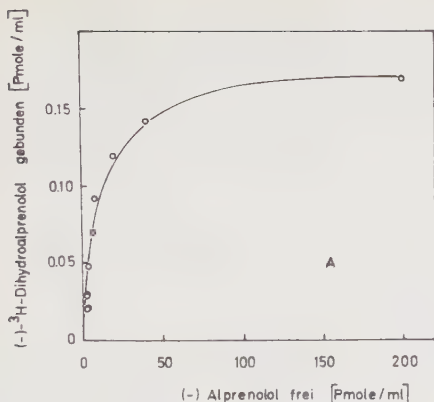
das untersuchte Pharmakon als eine die Bindung der Substanz zum Rezeptor charakterisierende Eigenschaft leicht errechnen.

Das Verhältnis strukturspezifischer Pharmaka und ihrer Rezeptoren kann außerdem durch konzentrationsabhängige Rezeptorbindungsexperimente analysiert werden, wobei diese im Äquilibrium, d.h. bei gleich großen Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{+1} durchgeführt werden müssen. Es ist dabei gleichgültig, ob das Pharmakon in seiner radioaktiv markierten Form in steigender Konzentration dem Rezeptorprotein zugesetzt wird oder ob eine bestimmte gleichbleibende Menge des radioaktiv markierten Pharmakons mit steigenden Konzentrationen seiner unmarkierten Form und dem Rezeptorprotein inkubiert wird. Voraussetzung ist, daß sich der markierte und der unmarkierte Ligand mit gleicher Affinität an den Rezeptor binden. Nach Erreichen des Äquilibrium werden die gebundenen Liganden von den freien z.B. durch Vakuumfiltration getrennt und gegeneinander graphisch aufgetragen, wobei es eine Vielfalt von Auftragungsmöglichkeiten gibt (20). Bei direkter graphischer Auftragung der Meßdaten wird der gebundene Ligand B gegen den freien Liganden F quantitativ erfaßt (Abb. 3 A). Bei dieser Darstellungsart kann die Gesamtzahl der Bindungsstellen experimentell nur annähernd bestimmt werden, da diese sich bei hoher Ligandenkonzentration asymptotisch einem Maximalwert nähern. Außerdem kann aus dem Kurvenverlauf nicht erkannt werden, ob es sich um eine homogene Rezeptorpopulation mit einer einzigen Dissoziationskonstante zum eingesetzten Liganden handelt.

Scatchard (152) hat durch Umformung des Massenwirkungsgesetzes eine Gleichung aufgestellt, die für den Fall einer gleichbleibenden Dissoziationskonstante K_D eine Gerade ergibt, wenn B/F gegen B aufgetragen wird ($B/F = K_D(B)$) (Abb. 3 B). Der Schnittpunkt mit der B-Achse, der durch Extrapolation der Kurve erhalten werden kann, zeigt die maximal mögliche spezifische Bindung, bezogen auf die eingesetzte Proteinkonzentration (Mole/ x mg Protein). Durch Umrechnung auf 1 mg Protein

und unter Berücksichtigung der Loschmidt'schen Zahl ($6,06 \times 10^{23}$ Moleküle/Mol) kann daraus die Anzahl der Bindungsstellen/mg Protein angegeben werden. Der Anstieg der Kurve ergibt hier die Dissoziationskonstante K_D ; eine Gerade ist dementsprechend durch einen ganz bestimmten K_D -Wert definiert und bezeichnet somit eine homogene Rezeptorpopulation mit einer ganz bestimmten Affinität zum gebundenen Liganden. Eine gekrümmte Kurve, z.B. nach oben konkav, ist dagegen Ausdruck von mindestens zwei verschiedenen K_D -Werten und damit Rezeptoren. Es kann dabei nicht unterschieden werden, ob es sich um zwei (oder mehr) morphologisch verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zum gleichen Liganden handelt oder um verschiedene Konfigurationen eines Rezeptors, dessen Affinität zum Liganden bei zunehmender Besetzung der Rezeptoren abnimmt (negative Kooperativität). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Phänomenen, wie z.B. Polymerisation von Liganden, radioaktive Verunreinigung, Metabolisierung von Liganden oder Veränderung von Membranpartikeln während der Inkubation (42, 53, 145, 175), die bei der Auftragung nach Scatchard eine gekrümmte Kurve ergeben und somit verschiedene Dissoziationskonstanten der Rezeptoren vortäuschen. Dennoch ist die Auftragung nach Scatchard bei Rezeptorbindungsstudien die gebräuchlichste graphische Auftragsart, da hierdurch zwei wichtige Parameter - Dissoziationskonstante und Gesamtzahl der Bindungsstellen - einfach und hinreichend genau ermittelt werden können.

Aus pharmakologischen Untersuchungen mit adrenergen Substanzen und aufgrund der beschriebenen Definition eines Rezeptors, wobei auf die Wechselwirkung Pharmakon - Rezeptor das Massenwirkungsgesetz anwendbar ist, wurden folgende theoretische Kriterien einer spezifischen Pharmakon-Betarezeptor-Bindung aufgestellt (7, 35, 69, 74, 121): Sie muß rasch erfolgen entsprechend dem schnellen Wirkungseintritt beta-adrenerger Substanzen z.B. am isolierten Herzpräparat. Die Bindung muß reversibel sein und stereospezifisch, da sich bei in-vivo-Untersuchungen gezeigt hat, daß (-)isomere Formen



A: Direkte Auftragung

B: Auftragung nach Scatchard

Abb. 3 A und B

Äquilibriumbindung eines strukturspezifischen Liganden: unterschiedliche graphische Auftragung

beta-adrenerger Substanzen einen größeren biologischen Effekt als (+)isomere Formen zur Folge haben. Beta-blockierende Substanzen wie z.B. Propranolol müssen mit hoher Affinität an den Rezeptor gebunden werden in Analogie zu dem bereits bei geringer Konzentration nachweisbaren biologischen Effekt. Wenn beta-adrenerge Substanzen, um wirksam werden zu können, an Rezeptoren gebunden werden, dann muß deren Anzahl bestimmbar sein, und die Reaktion zwischen Pharmakon und Rezeptoren muß einer Sättigungskinetik folgen.

Auch beim biochemischen Nachweis der Betarezeptoren, sei es an isolierten Organpräparaten oder sei es an isolierten Membranen, müssen die genannten Kriterien einer spezifischen Pharmakon-Rezeptor-Bindung erfüllt werden. Dieser Nachweis gelang bereits vor mehreren Jahren durch die Einführung radioaktiv markierter, hochaffiner beta-adrenerger Antagonisten wie $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol (7), ^3H -Propranolol (8) und ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol (9, 25, 160). Lefkowitz et al. (93-98), Aurbach et al. (9,10), Levitzki et al. (105) u.a. wie-

sen damit spezifische beta-adrenerge Bindungsproteine in verschiedenen Geweben mehrerer Spezies, z.B. am Kaninchenherzen (7), an Truthahnerythrozyten (8, 9, 17, 25, 26, 105), an Froscherythrozyten (93, 98, 130), an Affenerythrocyten (10), an Herz, Lunge, Leber und Skelettmuskel vom Hund (93), an Rattenerythrocyten (77), am Rattenherzen (66, 120), am Rattenhirn (160), an Zellkulturen wie Rattengliomazellen (121) und am Meerschweinchenherzen (84) nach. Dabei zeigte sich, daß durch steigende Konzentrationen anderer Betarezeptorenblocker oder durch Agonisten eine kompetitive Verdrängung aus der Rezeptorbindung entsprechend der Wirksamkeit in vivo nachweisbar war und daß die (-)Stereoisomere im Vergleich zu den (+)Stereoisomeren auch an isolierten Membranpräparationen etwa 100fach stärker wirksam sind. Aus der Bindungskapazität, die für Antagonisten und auch für Agonisten im femtomolaren Bereich pro mg Protein liegt, läßt sich überschlagsweise eine Rezeptordichte von etwa $1-10/\mu\text{m}^2$ in verschiedenen Geweben errechnen (120). Diese relativ geringe Dichte im Vergleich zu anderen Hormon- bzw. Pharmakonrezeptoren erklärt manche methodischen Schwierigkeiten des Nachweises.

Die an isolierten Membranpräparationen sowie an ganzen Erythrozyten gemessene Dissoziationskonstante für Antagonisten wie (-)Alprenolol, (-)Propranolol und (+)Pindolol lag im nanomolaren Bereich. Die hohe Spezifität ihrer Bindung wird damit deutlich. Die Agonisten Isoprenalin, Noradrenalin und Adrenalin haben hingegen erst bei einer freien Konzentration im mikromolaren Bereich die Hälfte der Betarezeptoren besetzt.

Früher durchgeführte Bindungsversuche am beta-adrenergen Rezeptor mit radioaktiv markierten Catecholaminen (^3H -Isoprenalin, ^3H -Dopamin) (92, 119) wiesen eine geringe Affinität zum Betarezeptor auf und zeigten eine sehr langsame Bindung an den Rezeptor (ca. 2 h bis zum Äquilibrium bei 37°C); außerdem war die Bindung zum Teil weder reversibel noch stereospezifisch. Ein Nachweis von beta-adrenergen Bindungsstellen durch diese Agonisten war damit also nicht gelungen. Dies war erst möglich durch die Verwendung von $\text{dl-}^3\text{H}$ -Adrenalin (166)

unter Zugabe von Pyrocatechol und Phentalamin bzw. von ^3H -Hydroxybenzylisoprenalin (101, 102), einem im Vergleich zu 1-Isoprenalin 10mal wirksameren Agonisten, wobei die Bindungsversuche in Gegenwart von Catechol und Ascorbinsäure durchgeführt werden mußten. Diese beiden Substanzen setzen die unspezifische Bindung herab. Obwohl sich nun beta-adrenerge Agonisten und Antagonisten an die gleichen Membranrezeptoren zu binden scheinen (101, 179), gibt es Unterschiede an den durch radioaktiv markierten Agonisten und Antagonisten nachgewiesenen beta-adrenergen Bindungsproteinen: 1. Die Bindung von ^3H -Hydroxybenzylisoprenalin an Membranen von Froscherythrocyten ist nur langsam reversibel. 2. ^3H -Hydroxybenzylisoprenalin dissoziiert in Gegenwart von Guanin-Nukleotiden ebensoschnell vom beta-adrenergen Rezeptor wie $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von Antagonisten wird durch Nukleotide nicht beeinflusst. 3. Substanzen, wie z.B. N-Äthylmaleimid, welche die Catecholamin-stimulierte Adenylatzyklaseaktivität verändern, beeinflussen auch die Bindung von ^3H -Hydroxybenzylisoprenalin an den Rezeptor; das Bindungsverhalten von Antagonisten am beta-adrenergen Membranprotein bleibt dabei gleich. Anhand dieser Ergebnisse wurde die These aufgestellt, daß der beta-adrenerge Rezeptor durch die Bindung von Agonisten in einen Konformationszustand überführt wird, der eine Aktivierung der Adenylatzyklase in Gegenwart von Nukleotiden ermöglicht (179).

Das mit biochemischen Methoden meßbare Bindungsverhalten eines beta-adrenergen Pharmakons am Rezeptor läßt jedoch lediglich eine Aussage über die Affinität zu, nicht aber eine über die das beta-adrenerge System hemmende oder stimulierende Wirkung (139). Sowohl der beta-adrenerge Agonist als auch der beta-adrenerge Antagonist werden von dem gleichen Rezeptor gebunden; die dadurch ausgelöste biologische Antwort ist aber ganz verschieden, wobei die Betarezeptor-gekoppelte Adenylatzyklase durch Agonisten stimuliert und durch Antagonisten grundsätzlich nicht beeinflusst wird. Eine Differenzierung beta-adrenerger Substanzen in Agonisten und Antagonisten ist daher erst möglich, wenn die durch die Pharmakon-Bindung ausgelöste Aktivität der Betarezeptor-gekoppelten Adenylatzy-

klase gemessen wird (130). Während die Kopplung des beta-adrenergen Rezeptors mit der Adenylatzyklase als erwiesen gilt, ist es noch vollkommen unklar, mit welchem Enzymsystem der alpha-adrenerge Rezeptor in Verbindung steht, wenngleich es Hinweise gibt, daß über manche Alpharezeptoren die Adenylatzyklase gehemmt werden kann (102, 156).

Durch radioaktiv markierte alpha-adrenerge Antagonisten wie ^3H -Dihydroergocryptin (62, 155) und ^3H -Prazosin (71) war in letzter Zeit auch der biochemische Nachweis von Alpharezeptoren erbracht worden. Schümann und Brodde (155) konnten an derselben Membranpräparation vom Kaninchenherzen sowohl Alpharezeptoren als auch Betarezeptoren nachweisen. Die Bindung von ^3H -Dihydroergocryptin an die Membran war rasch reversibel und stereospezifisch; sie zeigte außerdem eine Sättigungskinetik und eine hohe Affinität mit einer Dissoziationskonstanten von ca. 10 nM. Die Anzahl der Bindungsstellen für ^3H -Dihydroergocryptin betrug 80 Femtomole pro mg Protein. Im Vergleich dazu wurde für (-)- ^3H -Dihydroalprenolol an dieser Membran eine Dissoziationskonstante von ca. 8 nM gemessen, und die maximale Anzahl von Bindungsstellen war 115 Femtomole pro mg Protein.

Die Fähigkeit adrenerger Agonisten, die Bindung von ^3H -Dihydroergocryptin an der Membran zu hemmen, nahm mit folgender Reihenfolge ab: 1-Adrenalin > 1-Phenylephrin >> 1-Isoprenalin; 1-Isoprenalin war dabei 600mal schwächer wirksam als 1-Adrenalin. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der Wirkstärke adrenerger Substanzen in pharmakologischen Dosis-Wirkungs-Untersuchungen überein, anhand derer der alpha-adrenerge Rezeptor definiert worden ist (3, 58). Adrenerge Antagonisten zeigten hier in analoger Weise eine für den Alpharezeptor typische Wirkstärke, wobei Phentolamin die Bindung von ^3H -Dihydroergocryptin am Rezeptor deutlich stärker hemmte als der beta-adrenerge Antagonist (-)Propranolol. Im Gegensatz dazu zeigten die an der gleichen Membran mit (-)- ^3H -Dihydroalprenolol nachgewiesenen Bindungsstellen die für beta-adrenerge Rezeptoren typischen Eigenschaften. Die Fähigkeit

adrenerger Agonisten, die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol zu hemmen, nahm hier in folgender Reihenfolge ab: 1-Isoprenalin > 1-Adrenalin > 1-Phenylephrin. Der beta-adrenerge Antagonist $(-)$ Propranolol hemmte die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol am Rezeptor erwartungsgemäß viel stärker als der alpha-adrenerge Antagonist Phentolamin.

Der biochemische Nachweis eines weiteren adrenergen Rezeptors, des bereits anhand pharmakologischer Untersuchungen definierten Dopaminrezeptors, ist durch radioaktiv markierte dopaminerge Substanzen wie z.B. ^3H -Dopamin (30), ^3H -Dihydroergocryptin (32) und ^3H -cis-Flupenthixol (73) gelungen. Auch hier ergab sich eine erstaunliche Übereinstimmung zwischen der auf molekularer Ebene gemessenen Affinität einer Reihe von dopaminergen Pharmaka zu den spezifischen Rezeptoren und der Wirkstärke dieser Substanzen, die durch Dosis-Wirkungs-Untersuchungen ermittelt worden ist. Die üblichen alpha- und beta-adrenergen Substanzen zeigten hier fast keinen Effekt. Einschränkend muß jedoch betont werden, daß über Dopaminrezeptoren vermittelte physiologische Funktionen, wie z.B. stereotypes Verhalten von Ratten und neurologische oder psychiatrische Veränderungen beim Menschen, experimentell schlecht quantifiziert werden können. Durch die Anwendung radioaktiv markierter, dopaminergischer Substanzen bestätigte sich auch die vorläufige Einteilung der Dopaminrezeptoren in zwei Gruppen (80). Die einen vermitteln ihre biologische Antwort über eine Aktivierung der Adenylatzyklase. Sie wurden z.B. im menschlichen Gehirn (besonders Nucleus caudatus), in der Niere und in Epithelkörperchen vom Rind nachgewiesen, und man nennt sie Dopamin₁-Rezeptoren. Die anderen sind nicht an die Adenylatzyklase gekoppelt, und man fand sie z.B. im Hypophysenvorderlappen von Säugetieren, wo sie die Freisetzung von Prolaktin hemmen; diese Gruppe nennt man Dopamin₂-Rezeptoren. Der wirksamste Agonist an beiden Rezeptortypen war Dopamin, das am Dopamin₁-Rezeptor im mikromolaren Bereich und am Dopamin₂-Rezeptor im nanomolaren Bereich wirkte (80). Apomorphin ist am Dopamin₂-Rezeptor ein reiner Agonist, wohingegen es am Adenylatzyklase-gekoppelten Dopamin-

Rezeptor eine partiell agonistische bzw. eine antagonistische Wirkung entfaltet. Dopaminerge Ergotamine wie Bromocriptin sind am Dopamin₂-Rezeptor sehr potente Agonisten und werden z.B. bei Galaktorrhoe und zur Hemmung der Laktation post partum gegeben. Am Dopamin₁-Rezeptor wirken sie antagonistisch. Das Antiemetikum Metoclopramid ist ein selektiver Dopamin₂-Antagonist. Die meisten Psychopharmaka sind dopaminerge Antagonisten, ohne daß bisher eine Selektivität an einem der beiden Dopaminrezeptoren nachgewiesen werden konnte. Bemerkenswert ist, daß der Dopamin₂-Agonist Bromocriptin das Bild einer paranoiden Psychose induzieren kann (80).

1.4 Das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System

Wesentliche Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus von Hormonen gehen auf Untersuchungen von Sutherland et al. zurück (144, 162, 163). Anhand radioaktiv markierter Zwischenprodukte konnten sie zeigen, daß die durch Adrenalin oder Glucagon hervorgerufene Glykogenolyse von der Aktivierung einer Phosphorylase abhängig ist, wofür wiederum ATP und Mg^{++} notwendig waren. Die Aktivierung der Phosphorylase als Antwort auf Adrenalin am Lebergewebshomogenat von Ratten war nicht nachweisbar, wenn man das Homogenat vorher abzentrifugierte. Durch erneute Mischung von Überstand und Sediment konnte dagegen wieder eine Enzymaktivierung gemessen werden (144). Der für die Aktivierung der Phosphorylase notwendige Faktor wurde von Lipkin et al. (113) als zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) identifiziert. Das Enzym, das für die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat verantwortlich war, nannte man Adenylatzyklase. Walsh et al. (170) wiesen eine Proteinkinase nach, die unter Mitwirkung von cAMP durch Phosphorylierung vom inaktiven in den aktiven Zustand überführt wird und dann z.B. Phosphorylasen und Lipasen aktiviert und die Glykogensynthetase inaktiviert. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde das in Abb. 1 dargestellte Betarezeptor-gekoppelte Adenylatzyklasesystem entwickelt. Der Betarezeptor befindet sich dabei an der Membran-

außenseite, die Adenylatzyklase an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (19, 106). Sowohl beta-adrenerge Agonisten als auch beta-adrenerge Antagonisten besetzen den Betarezeptor, aber nur durch die Bindung von Agonisten wie z.B. Isoprenalin wird die Adenylatzyklase aktiviert. Betarezeptorblockierende Pharmaka verdrängen aufgrund eigener, meist höherer Affinität die Betastimulatoren aus der Rezeptorbindung und hemmen dadurch die Aktivierung der Adenylatzyklase (26, 96, 97, 120, 122).

Orly und Schramm (133) konnten nachweisen, daß der Betarezeptor und die Adenylatzyklase zwei verschiedene Moleküle sind, die unter entsprechenden experimentellen Bedingungen voneinander getrennt und dann auch wieder funktionell zusammengebracht werden können. Die Untersucher haben dazu die an den Betarezeptor gekoppelte Adenylatzyklase von Truthahnerythrocyten durch 10 mM N-Äthylmaleimid inaktiviert. Die somit als Rezeptorquelle dienenden Truthahnerythrozyten wurden dann in Gegenwart von Sendai-Viren mit sogenannten F-Zellen inkubiert. F-Zellen sind erythroleukämische Zellen, die zwar eine durch Fluorid, jedoch nicht durch Isoprenalin stimulierbare Adenylatzyklase besitzen; erwartungsgemäß konnten Orly und Schramm (133) an den F-Zellen durch Bindungsstudien mit 125 J-Hydroxybenzylpindolol keine beta-adrenergen Rezeptoren nachweisen. An den Zellghosts der durch die Viren mit den F-Zellen fusionierten vorbehandelten Truthahnerythrozyten konnte die Aktivität der Adenylatzyklase durch Isoprenalin deutlich gesteigert werden. Dies war an keiner der beiden Zellgruppen vor der Fusion möglich gewesen. Die durch Isoprenalin ausgelöste Adenylatzyklaseaktivierung war dabei abhängig von der Menge der Betarezeptoren, die auf die F-Zellen übertragen worden sind. Im Gegensatz dazu hatte der Kopplungsvorgang auf die Basalaktivität und die durch Fluoride vermittelte Aktivität der Adenylatzyklase an den F-Zellen keinen Einfluß. Wurden die Betarezeptoren an den Truthahnerythrocyten durch DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) zerstört, dann konnte nach der Fusion mit F-Zellen keine Isoprenalin-stimulierbare Adenylatzyklase-

aktivität gemessen werden. Andere Autoren (75, 97, 112) bestätigten, daß der Betarezeptor und die Adenylatzyklase zwei unterschiedliche Makromoleküle sind. Limbird und Lefkowitz (112) z.B. gelang an Membranen von Froscherythrocyten die Trennung von beta-adrenergem Bindungsprotein und Enzymeinheit mit Hilfe von Digitonin und anschließender Gelchromatografie. Aus pharmakologischen und biochemischen Untersuchungen weiß man, daß die Adenylatzyklase außer von Catecholaminen (18, 67, 115) auch von einer Reihe anderer Hormone (44), wie Glucagon (67, 147, 162), Schilddrüsenhormon (182), ACTH (67, 115), Somatotropes Hormon, Vasopressin und Prostaglandin (19, 182) aktiviert werden kann. An einem Organ können nun ein oder mehrere Hormone die Adenylatzyklase stimulieren, wie z.B. Catecholamine, Glucagon und Schilddrüsenhormon am Herzen und ACTH an der Nebennierenrinde (115). An der Fettzelle von Ratten erhöhten Catecholamine, Glucagon, ACTH, Sekretin und TSH die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (67). Sind nun mehrere Hormone, die an einem Organ die Adenylatzyklase stimulieren, gleichzeitig anwesend, dann verhalten sie sich weder kompetitiv an der Bindungsstelle, noch aktivieren sie das Enzym unbeschränkt additiv (75, 147, 162). Die Adenylatzyklase scheint also das gemeinsame Endglied mehrerer Rezeptoren zu sein und kann von jedem einzelnen Hormon sowie von mehreren zusammen nur bis zu einem Maximum stimuliert werden. Der Kopplungsmechanismus zwischen Rezeptor und Adenylatzyklase gewinnt damit eine ganz besondere Bedeutung.

Rodbell konnte bereits vor Jahren (146) am Glucagon-Adenylatzyklase-System in Leberzellmembranen von Ratten zeigen, daß Nukleotide wie GTP einerseits die Affinität des Rezeptors zu dem Hormon durch Beschleunigung der Dissoziation herabsetzen und andererseits die hormoninduzierte Aktivierung der Adenylatzyklase verstärken. GTP zeigte diesen Effekt bei einer Konzentration von 10^{-8} M, ATP wirkte hier erst in 3fach höherer Konzentration. Gpp(NH)p, ein synthetisches GTP-Analogon, zeigte auch in Abwesenheit des Hormons eine deutliche Enzymstimulierung. Gpp(NH)p wird im Gegensatz zu GTP von der GTPase nicht

hydrolysiert und aktiviert wohl deshalb die Adenylatzyklase irreversibel. Dieser Einfluß der Nukleotide auf die Hormonbindung und die Aktivität der Adenylatzyklase konnte auch für andere Adenylatzyklase-gekoppelte Hormonsysteme nachgewiesen werden (18, 19, 67, 115, 120, 182). Aufgrund theoretischer Überlegungen und experimenteller Befunde wurde daher bereits von Rodbell (147) gefordert, daß das Rezeptor-Adenylatzyklase-System aus 3 Komponenten besteht: 1. dem Hormon- bzw. Pharmakorezeptor, 2. dem nukleotidbindenden Protein als regulatorischer Einheit und 3. der katalytischen Komponente, an der ATP, das Substrat zur Bildung von cAMP, gebunden wird.

Pfeuffer (137) konnte kürzlich durch ein Affinitätschromatographisches Verfahren mit GTP-Sepharose vom Adenylatzyklasesystem in Membranen von Taubenerythrocyten ein nukleotidbindendes Protein abspalten. Dadurch wurde zugleich die durch Nukleotide oder durch Fluorid stimulierte Adenylatzyklase gehemmt. Das nukleotidbindende Protein mit einem Molekulargewicht von 42 000 war an die GTP-Matrix der Säulen gebunden und somit vom übrigen Adenylatzyklasesystem abgetrennt worden. Durch Eluierung des nukleotidbindenden Proteins von der GTP-Matrix mit Hilfe von GTP oder Gpp(NH)p und erneute Inkubation mit dem nicht an die Matrix gebundenen Anteil des Adenylatzyklasesystems konnte das Enzym wieder stimuliert werden. Pfeuffer (137) konnte außerdem durch Verwendung eines radioaktiv markierten GTP-Derivats die GTP-Bindungsstellen des Catecholamin-stimulierten Adenylatzyklasesystems biochemisch nachweisen. Die Bindung des radioaktiv markierten Nukleotids, dessen Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-7} M lag, wurde durch Gpp(NH)p und GTP kompetitiv gehemmt. Durch Zentrifugation im Dichtegradienten konnten über 95 % der Nukleotidbindungsproteine vom übrigen Adenylatzyklasesystem abgetrennt werden, ohne die Enzymaktivität zu hemmen. Diejenigen Nukleotidbindungsproteine, die nach Abzentrifugation einen Aktivitätsverlust der Adenylatzyklase verursachten, hatten ein Molekulargewicht von 42 000.

Untersuchungen am Betarezeptor-Adenylatzyklase-System, z.B. an Membranpräparationen von S49 Lymphoma-Zellen (120), haben ergeben, daß Nukleotide wie GTP, ITP, Gpp(NH)p, und XTP die

Affinität von l-Isoprenalin zum Rezeptor in gleicher Weise um den Faktor 10 erniedrigen. Einen ähnlichen Einfluß haben Nukleotide auf die Bindung von l-Isoprenalin an den Betarezeptor von Froscherythrozyten und Fettzellen von Ratten, nicht jedoch von Membranen von Truthahnerythrocyten und Rat-tenerythrocyten gezeigt (120). Die Nukleotide wurden dabei in einer Konzentration von 300 μM eingesetzt; in diesem Konzentrationsbereich bewirkten sie eine maximale, durch Isoprenalin erreichbare Aktivierung der Adenylatzyklaseaktivität. ATP macht insofern eine Ausnahme, als es in einer sehr viel höheren Konzentration zugefügt werden muß, um die Affinität von Agonisten zum Betarezeptor herabzusetzen. Im Konzentrationsbereich von 0,1-0,5 mM, der für die Durchführung des Adenylatzyklaseassay nötig ist, beeinflusst ATP das Bindungsverhalten von beta-adrenergen Agonisten nicht. Nicht hydrolysierbare Nukleotidderivate wie Gpp(NH)p aktivieren die Adenylatzyklase auch in Abwesenheit von Isoprenalin. GTP, ITP u.a. dagegen stimulieren das Enzym nur in Gegenwart eines beta-adrenergen Agonisten; Isoprenalin allein wiederum löst keine meßbare Steigerung der Adenylatzyklaseaktivität aus. Die Bindung von l-Isoprenalin an den beta-adrenergen Rezeptor von S49 Lymphoma-Zellen zeigte in Abwesenheit eines Nukleotids eine Dissoziationskonstante von 80 nM. Die Bindung eines beta-adrenergen Agonisten an den Betarezeptor ist somit alleine noch nicht ausreichend, um eine biologische Antwort hervorzurufen. Bei Zugabe von 0,1 μM GTP wurde die Bindung von l-Isoprenalin an den Betarezeptor noch nicht beeinflusst, die Adenylatzyklase wurde jedoch durch l-Isoprenalin deutlich stimuliert, wobei eine K_{act} von 30 nM gemessen wurde (K_{act} ist die Agonisten-Konzentration, die notwendig ist, um die Adenylatzyklase halbmaximal zu stimulieren). K_D und K_{act} sind unter diesen Bedingungen also fast gleich groß. Setzte man dagegen GTP mit der maximal wirksamen Dosis von 100 μM ein, dann erhöhten sich die K_D für Isoprenalin auf 500 μM und die K_{act} auf 100 μM ; die K_D wurde somit deutlich größer als K_{act} (120). Die Affinität beta-adrenerger Antagonisten wird in Gegenwart von Nukleotiden nicht verändert. Das Verhältnis von K_D zu K_I ist in

fast allen untersuchten Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systemen annähernd 1 (120). Mit K_I bezeichnet man diejenige Konzentration eines Antagonisten, die notwendig ist, um die Isoprenalin-stimulierte Adenylatzyklase um 50 % zu hemmen. Das Verhältnis von K_D/K_{act} ist dagegen an den einzelnen Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systemen verschiedener Organe außerordentlich variabel. Das Verhältnis zwischen dem Ausmaß der Agonist-Rezeptor-Bindung und der Menge des produzierten zyklischen Adenosinmonophosphats hängt außerdem von den jeweiligen Guanylnukleotidkonzentrationen und von den einzelnen beta-adrenergen Agonisten ab (72, 120).

Das einfache Schema der beta-adrenergen Stimulatoren- und Blockerwirkung (Abb. 1) konnte also experimentell im Prinzip bestätigt werden. Derzeit wird diskutiert (102, 120), daß durch die Bindung von Isoprenalin an den Betarezeptor - wahrscheinlich infolge einer Konformationsänderung - die Bindung von GTP an das nukleotidbindende Protein ermöglicht wird. Diese Reaktion führt dann einerseits zur Aktivierung der Adenylatzyklase, andererseits verursacht die Bindung von GTP an das Kopplungsprotein eine verminderte Affinität des Rezeptors zu Isoprenalin. Der Agonist dissoziiert daraufhin vom Rezeptor, der nun frei ist für die erneute Bindung eines Catecholaminmoleküls bzw. eines Betarezeptorenblockers. Durch die Catecholaminbindung wird, wie Cassel und Selinger (33) an Membranen von Truthahnerythrocyten gezeigt haben, die GTPase stimuliert, ein Enzym, welches an das Kopplungsprotein gebundenes GTP hydrolysiert. Die Basalaktivität der GTPase wird durch beta-adrenerge Agonisten nicht beeinflußt. Die Reindarstellung der GTPase ist bisher noch nicht gelungen, wenngleich sich Hinweise ergeben, daß dieses Enzym Teil des nukleotidbindenden Proteins oder sogar damit identisch sein könnte (106). Durch die Hydrolyse des am Kopplungsprotein gebundenen GTP-Moleküls entsteht GDP oder GMP, welches die Aktivität der Adenylatzyklase hemmt (33). Kann nun das gebundene Nukleotid wie z.B. Gpp(NH)p nicht hydrolysiert werden, dann wird die einmal stimulierte Adenylatzyklase auch nicht mehr gehemmt, d.h. sie ist durch die Bindung von Gpp(NH)p an das Kopplungsprotein irreversibel aktiviert worden (106).

1.5 Bedeutung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems für verschiedene Erkrankungen und für die Betablocker-therapie

Es gibt nun eine Reihe von Substanzen, die mit verschiedenen Komponenten des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems reagieren und über eine Änderung der Adenylatzyklaseaktivität eine modifizierte biologische Antwort hervorrufen. Auch bei verschiedenen Krankheiten konnte eine primäre Störung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems gezeigt werden. Es konnte z.B. an Truthahnerythrocyten nachgewiesen werden, daß Cholera-toxin die Catecholamin-stimulierte GTPase hemmt und dadurch die Adenylatzyklase irreversibel stimuliert (34). Die Basalaktivität der Adenylatzyklase wurde dabei um das 10fache erhöht, und die durch Isoprenalin, und GTP vermittelte Enzymaktivität stieg um 500 %. Einen ähnlichen, wenn auch geringeren Effekt auf die Adenylatzyklase zeigte Gpp(NH)p. Die Isoprenalin-stimulierte Adenylatzyklase konnte, wie erwartet, weder in Gegenwart von Cholera-toxin noch von Gpp(NH)p durch Propranolol gehemmt werden (34). Die Wirkung des Cholera-toxins auf die Adenylatzyklase ist unspezifisch, d.h. an allen Adenylatzyklasesystemen nachweisbar (16). Das Krankheitsbild der Cholera als Infektionskrankheit ergibt sich aus dem Wirkort der Cholera-toxine an der luminalen Plasmamembran der Dünndarmepithelzelle. Infolge der irreversiblen Stimulierung der Adenylatzyklase mit cAMP-Anhäufung sezerniert die Dünndarmzelle in gesteigertem Maße Flüssigkeit und Elektrolyte in das Darmlumen und bewirkt so eine massive Diarrhoe. Exotoxine von Colibakterien scheinen an derselben Stelle des Adenylatzyklasesystems anzugreifen wie Cholera-toxine und verursachen demnach die Diarrhoe über den gleichen Wirkungsmechanismus (158). Natürlich vorkommende gastrointestinale Hormone wie Prostaglandine und vasoaktive intestinale Peptide können ebenfalls die Adenylatzyklase der Dünndarmepithelzelle aktivieren. Im Gegensatz zum Cholera-toxin wirken sie über den Blutweg über spezifische Rezeptoren an der Membranaußenseite der Darmzelle. Für schwere Diarrhoen im Rahmen von Prostaglandin-sezernierenden medullä-

ren Karzinomen der Schilddrüse sowie Tumoren der Neuralleiste wird eine Aktivierung der Adenylatzyklase des Dünndarms durch Prostaglandin verantwortlich gemacht. Bei Patienten mit sogenanntem pankreatischem Cholerasyndrom, einem mit Diarrhoen einhergehenden Pankreastumor, konnte im Plasma und im neoplastischen Gewebe eine erhöhte Konzentration von vasoaktiven intestinalen Peptiden gemessen werden.

Die Beobachtung, daß typische Symptome der Hyperthyreose, wie Tachykardie, Herzklopfen, Schwitzen, Tremor, Ruhelosigkeit und Nervosität, durch Betablocker günstig beeinflußt werden konnten, hat zu weiteren Untersuchungen des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems bei hyperthyreoter Stoffwechsellage geführt. So haben nach experimenteller Applikation von Schilddrüsenhormonen mehrere Arbeitsgruppen eine ausgeprägte Zunahme von Betarezeptoren bei unveränderter Affinität in Rattenherzen gemessen (37, 178). Wahrscheinlich ist ein stimuliertes adrenerges System für einen Teil der hyperthyreoten Symptome verantwortlich, die dann tatsächlich auch durch Antagonisten wie Propranolol weitgehend behoben werden können (89, 104). Im Gegensatz dazu hat man bei hypothyreoten Tieren eine deutliche Abnahme der funktionellen Betarezeptoren gemessen (37), was die erhöhte Empfindlichkeit hypothyreoter Patienten gegenüber einer Betablockertherapie verständlich machen würde. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß bei hypothyreoten Ratten zusätzlich eine unspezifische Abnahme der Adenylatzyklaseaktivität besteht (23).

Als Desensibilisierung wird eine verminderte Ansprechbarkeit des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems nach erhöhter Catecholamineinwirkung bezeichnet; sie beruht wahrscheinlich auf einer Reduzierung von Betarezeptoren. So wurden an Froscherythrocyten nach Vorinkubation mit Isoprenalin deutlich weniger Bindungsstellen für $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol gemessen als ohne vorherige Catecholaminexposition (102). Nach anschließender Inkubation mit Betablockern konnte wieder die ursprüngliche Menge an Betarezeptoren gemessen werden. Darüber hinaus konnte an menschlichen Lymphozyten nach einer 5tägigen Betablocker-

therapie eine 43%ige Zunahme beta-adrenerger Rezeptoren gemessen werden; die Affinität blieb dabei unverändert (1). Dadurch wird die gesteigerte Empfindlichkeit des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems unter der Therapie mit Betasympathikolytika verständlich, wobei es nach abruptem Absetzen der Betablocker trotz im Normbereich liegender Catecholaminspiegel zu einer vermehrten Stimulation dieses Systems mit übermäßiger Herzfrequenzzunahme und erhöhtem Sauerstoffverbrauch kommen kann (2, 118). Die im Alter nachweisbare verminderte Anzahl von Betarezeptoren, gemessen an menschlichen Lymphozyten, ist möglicherweise Ausdruck eines Desensibilisierungsprozesses, da bei älteren Menschen häufig ein erhöhter Catecholaminspiegel nachweisbar ist (153).

Auch bei asthmatischen Patienten und Kontrollpersonen mit chronischer Einnahme von Sympathikomimetika ist eine Abnahme der Betarezeptoren an Lymphozyten gemessen worden (39). Man hat jedoch auch bei Asthmatikern, die noch nicht mit Sympathikomimetika behandelt worden sind, eine Verminderung von Betarezeptoren festgestellt (24). Kürzlich konnte an Meerschweinchen mit experimentell induziertem Asthma eine Abnahme von beta-adrenergen und gleichzeitig eine Zunahme von alpha-adrenergen Rezeptoren nachgewiesen werden (11). Da eine Aktivierung von Alpharezeptoren an der Bronchialmuskulatur eine Konstriktion hervorruft und an den Mastzellen die Histaminfreisetzung fördert, könnte dieser Mechanismus eine nicht unwesentliche Rolle bei der Pathogenese von Asthma bronchiale spielen.

Bei Hypertonie unterschiedlicher Genese konnte eine 40-50%ige Abnahme sowohl von alpha-adrenergen als auch von beta-adrenergen Rezeptoren am Rattenherzen mit entsprechend verminderter Adenylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden. Die adrenergen Rezeptoren an Lunge und Niere dieser Ratten waren unverändert (183). Dies spricht mehr für eine spezifische Zunahme der Sympathikusaktivität am Herzen und weniger für einen allgemeinen Desensibilisierungseffekt im Rahmen eines erhöhten Catecholaminspiegels bei Hypertonie. Interessant ist, daß bei chronischer Guanethidinzufuhr, z.B. bei Hypertoniebehandlung, eine Zunahme beta-adrenerger Rezeptoren am Herzen gemessen werden

konnte (59). Möglicherweise ist dies Ausdruck einer verminderten Sympathikusaktivität unter dem Einfluß von Guanethidin.

In letzter Zeit ergaben sich Hinweise, daß beim insuffizienten Herzen und bei manchen Formen kardialer Hypertrophie die Zahl der beta-adrenergen Rezeptoren zunimmt. Da hierbei eine verminderte Catecholaminkonzentration im Herzgewebe gemessen wurde, könnte dies die Ursache der dann kompensatorisch vermehrten Betarezeptoren sein (109).

Das Betarezeptor-Adenylatzyklase-System hat sowohl für das Verständnis einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Cholera und Hyperthyreose, als auch für die Therapie mit spezifischen Pharmaka, wie Catecholamine und Betarezeptor-blockierenden Medikamenten, eine große Bedeutung. Insbesondere die Vielzahl von Betarezeptorenblockern zur Therapie von Hypertonie, hyperkinetischem Herzsyndrom, Angina pectoris, Symptomen bei Hyperthyreose u.a. mit teilweise sehr unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften der Medikamente (z.B. intrinsische Aktivität, kardiodepressive oder kardioselektive Wirkung) hat uns veranlaßt, dieses Betarezeptor-Adenylatzyklase-System näher zu untersuchen. Zum biochemischen Nachweis der Betarezeptoren standen uns (-)-³H-Dihydroalprenolol und ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol zur Verfügung.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Um die Betarezeptoren und die Interaktion mit einigen Betarezeptorenblockern näher zu charakterisieren, sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Messung einer spezifischen Bindung von Betarezeptorblockierenden Pharmaka an verschiedenen Geweben von Säugetieren (Herz und Lunge von Meerschweinchen).
2. Darstellung verschiedener Eigenschaften dieser spezifischen beta-adrenergen Bindungsstellen wie Stabilität und Affinität sowie die Quantifizierung dieser Bindungsstellen.

3. Nachweis einer möglichen kardioselektiven Bindung beta-adrenerger Pharmaka an spezifische Betarezeptoren.
4. Durch die Korrelation zwischen Rezeptorbesetzung und Änderung der Adenylatzyklaseaktivität soll versucht werden, einen weiteren Nachweis zu erbringen, daß das biologisch relevante Betarezeptor-Adenylatzyklase-System dargestellt wurde.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

Alle radioaktiv markierten Substanzen bezogen wir von New England Nuclear, 6072 Dreieich.

(-)-³H-Dihydroalprenolol mit einer spezifischen Radioaktivität von 32,6 Ci/mMol war gelöst in Äthanol und wurde bei -20°C gelagert.

¹²⁵J-Hydroxybenzylpindolol als Racemat (spezifische Radioaktivität 2200 Ci/mMol) wurde in Äthylacetat gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

³²P-Adenosin-5'-triphosphat-triäthylammoniumsalz mit einer spezifischen Radioaktivität von 10-30 Ci/mMol wurde in wässriger Lösung bei -20°C gelagert.

Zyklisches ³H-Adenosin-3'-5'-monophosphat-ammoniumsalz (spezifische Radioaktivität 39,8 Ci/mMol) bewahrten wir in 50%iger Äthanollösung bei -20°C auf.

Die folgenden Substanzen erhielten wir freundlicherweise von den jeweiligen Firmen bzw. Instituten:

l-Isoprenalin-d-bitartrat, d-Isoprenalin-bitartrat (Boehringer, Ingelheim); l-Adrenalin-bitartrat, Adrenalinhydrochlorid Racemat (Hoechst, Frankfurt); Dopamin (Gebr. Giulini GmbH, Ludwigshafen); Salbutamol (Fa. Glaxo Pharmazeutika GmbH, Bad Oldesloe); Versuchssubstanz MJ 8798-1 der Fa. Mead Johnson, Protokylol, Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly, Fenoterol, Terbutaline-Sulfat, Isoxsuprim, Versuchssubstanz H 35/25 der Fa. Hassle (Prof. Glossmann, Pharmakologisches Institut, Gießen); (-)Alprenolol, (+)Alprenolol, Metoprolol (Astra Chemicals GmbH, Wedel/Holstein); (-)Propranolol, (+)Propranolol, Atenolol (ICI-Pharma, Plankstadt); (±)Pindolol (Sandoz AG, Nürnberg); Timololmaleat (Sharp & Dohme GmbH, München); (+)Inpea HCl, (±)Inpea HCl (Selvi & C., Milano, Italien); (±)Bupranolol (Sanol Schwarz-Monheim GmbH).

Weiterhin wurden käuflich erworben: Rinderserumalbumin von Behringwerke (Marburg), Dextran T 500 von Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Schweden), Polyäthylenglykol 6000 von Serva (Heidelberg) und das Ca^{++} -freie ATP von Sigma (München); Analytical grade cation exchange Resin, Polypropylen-Säulen, Dowex-Pulver (AG 50 WX4) von Bio. Rad. Laboratories, 32nd Griffin sowie Aluminium-Oxid W 200 von ICN Pharmaceuticals GmbH, 3440 Eschwege.

Als Szintillationszähllösungen wurden Insta-Fluor (für nicht wäßrige Proben) und Insta-Gel (für wasserhaltige Proben) von der Firma Packard Instruments GmbH, Frankfurt, benutzt. Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von Boehringer, Mannheim, oder E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Als Versuchstiere dienten Meerschweinchen (Gewicht 250-500 g). Zur Fütterung wurde Altromin-Meerschweinchen-Standard-Diät (Fa. Altromin, Lage-Lippe) verwendet; Fütterung und Leitungswasser ad libitum.

2.2 Methoden zur Herstellung von Membransuspensionen

Zur Charakterisierung des beta-adrenergen Rezeptors an einzelnen Organen verschiedener Spezies findet man in der Literatur unterschiedliche Präparationsmethoden (7, 50, 66, 98, 167, 177). Diese Vielfalt der Membranpräparationen ist ein Ausdruck für die Schwierigkeit, den beta-adrenergen Rezeptor in Gewebeerextrakten mit Hilfe von Bindungsexperimenten nachzuweisen. Die Ursachen für dieses Problem sehen wir hauptsächlich in der geringen Rezeptordichte von etwa $1\text{-}10/\mu\text{m}^2$ (120) und in der hohen Empfindlichkeit des beta-adrenergen Bindungsproteins gegenüber experimentellen Manipulationen. Nach bereits publizierten Methoden haben wir in etwas modifizierter Form Herzmuskel- und Lungengewebe von Meerschweinchen für unsere Experimente gewonnen. Die einzelnen Membranpräparationen werden in diesem Kapi-

tel beschrieben. Eine Bewertung dieser Präparationsmethoden folgt in Kapitel 3. Die Proteinkonzentration pro ml Membransuspension wurde bei allen Membranpräparationen nach Lowry et al. (116) mit Rinderserumalbumin als Standard gemessen.

2.2.1 Membranpräparation nach Alexander et al. (7)

Herz: 10 Meerschweinchen mit einem Gewicht von je 250-500 g wurden durch Genickschlag getötet. Die Herzen wurden rasch entnommen, in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung gespült, sorgfältig von den Vorhöfen, dem Bindegewebe und den großen Gefäßen gesäubert und grob mit der Schere zerkleinert. Die Herzen wurden dann in ca. 90 ml gekühltem Präparationspuffer (0,25 M Saccharose, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris-HCl pH 7,45) mit einem auf 4°C vorgekühlten Gewebehomogenisator (Braun, Melsungen) 20-30 s lang bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Es wurden dann nochmals ca. 90 ml derselben Pufferlösung hinzugefügt und der Mixer wiederum 20-30 s auf Höchstgeschwindigkeit geschaltet. Das gewonnene Homogenat wurde nun 30 s in einem vorgekühlten Glas/Teflon-Potter (Braun, Melsungen) homogenisiert und anschließend 12 min lang bei 700 x g (Sorvall RC-5, Rotor SS34, 3000 Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde 12 min bei 10 000 x g (9 500 Upm) und dann 15 min bei 29 000 x g (17 000 Upm) im selben Rotor zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsvorgang wurde das Sediment in ca. 10 ml gekühltem Puffer (75 mM Tris-HCl pH 7,45, 25 mM $MgCl_2$) gelöst und ca. 30 s mit dem gekühlten Glas/Teflon-Potter homogenisiert. Nachdem die Membran über 6 Lagen Mull gefiltert worden war, konnten die Bindungsversuche durchgeführt werden. Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt und die Membran, sofern nichts anderes vermerkt ist, in Eis aufbewahrt. Die nach Lowry et al. (116) bestimmte Proteinkonzentration lag im Bereich von 2-3 mg Protein/ml.

Lunge: Die Präparation des Lungengewebes wurde, nachdem die Lungen vom Bindegewebe und den großen Blut- und Bronchialge-

fäßen befreit worden waren, in der gleichen Weise durchgeführt. Die Proteinkonzentration für unsere Bindungsversuche lag ebenfalls im Bereich von 2-3 mg Protein/ml.

2.2.2 Membranpräparation unter Verwendung eines Dextran-Polyäthylenglykol-Zweiphasensystems (27)

Werden wäßrige Lösungen zweier verschiedener Polymere gemischt, dann tritt häufig auch bei niedriger Konzentration der Polymere eine Trennung in zwei Schichten auf. Eine derartige Entmischung oder Inkompatibilität beruht auf einer nur teilweisen Mischbarkeit der beiden Polymere infolge ihrer unterschiedlichen hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften. Die Verteilung der Polymere hängt außerdem von deren Molekülgröße und von der Ladungsverteilung in dem System ab (6). Solche Systeme haben sich für die Trennung von Zellen, Zellpartikeln und Zellmembranen als nützlich erwiesen. Die Trennung z.B. von Membranpartikeln von den übrigen Zellbestandteilen geschieht in einem solchen Zweiphasensystem durch die unterschiedlichen Ladungen und Sedimentationskonstanten (171-173), wobei sich die Membranpartikel häufig zwischen den Schichten, d.h. in der Interphase, anreichern. Meist werden wäßrige Lösungen der Polymere Dextran (MG 500 000) und Polyäthylenglykol (MG 4000-6000) verwendet, da diese Substanzen die Zellen bzw. Membranpartikel nicht schädigen. Dextran reichert sich dabei vorwiegend in der unteren Phase und Polyäthylenglykol in der oberen Phase an (171). Die verwendeten Konzentrationen der Polymere liegen bei 3-5 %. Wir haben für unsere Membranpräparation zur Charakterisierung des beta-adrenergen Rezeptors das von Brunette (27) beschriebene Verfahren zur Zellmembranisolierung von Zellkulturen im Dextran-Polyäthylenglykol (D/PEG)-Zweiphasensystem modifiziert. Die dazu benutzten Grundlösungen wurden folgendermaßen vorbereitet:

Dextran T 500	20 % G/G	(in Aqua dest.)	200 g
Polyäthylenglykol 6000	30 % G/G	(in Aqua dest.)	103 g

Aqua dest.	99 ml
Phosphatpuffer (K-Salz) 0,22 M pH 7,45	333 ml
ZnCl ₂ 10 ⁻² M	80 ml

Die angegebenen Lösungen wurden in ein Becherglas gegeben und bei 4°C aufbewahrt, bis eine sichtbare Trennung der Lösungen eingetreten ist (ca. 1 h), wobei die obere Phase dann mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und getrennt aufbewahrt wurde.

In der Zwischenzeit wurde ein Meerschweinchenherz rasch entnommen, nach der Spülung in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung in 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, gelegt und sorgfältig von den Vorhöfen, dem Bindegewebe und den großen Gefäßen befreit. Das grob zerkleinerte Herz wurde dann in ca. 30 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, mit dem Ultraturrax (Jahnke & Kunke KG, Staufen) 10 s lang bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert und anschließend über 6 Lagen Mull gefiltert. Das Homogenat wurde dann 10 min bei 1500 x g (Sorvall RC-5, Rotor SS 34, 3500 Upm) zentrifugiert, das Sediment in 24 ml der getrennt aufbewahrten oberen Phase des D/PEG Systems gelöst, mit dem gekühlten Glas/Teflon-Potter ca. 15 s bei 4°C homogenisiert und davon jeweils ca. 6 ml in ein entsprechendes Cellulose-Nitrat-Zentrifugenröhrchen abgefüllt. In jedes der vier Röhrchen wurden nun 6 ml aus der unteren Phase des D/PEG-Zweiphasensystems hinzugefügt, gut durchgeschüttelt und 10 min lang bei 12 000 x g in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert (Beckmann L-5 50, Rotor SW 41 Ti, 9500 Upm); dabei reichert sich die Membran zwischen den beiden Phasen (= Interphase) an. Der Überstand und die Interphase wurden anschließend in ein neues Röhrchen abgegossen, durchgeschüttelt und nochmals 10 min im SW 41 Ti-Rotor bei 9500 Upm zentrifugiert. Die Membran, die sich wiederum in der Interphase angereichert hatte, wurde anschließend mit einer Pasteur-Pipette gesammelt, im 4-fachen Volumen 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, gelöst und 10 min bei ca. 4300 x g zentrifugiert (Sorvall RC-5, Rotor SS 34, 6000 Upm). Bei dieser geringen Konzentration bilden Dextran und Polyäthylenglykol kein Zweiphasensystem mehr, und die

Membran findet man jetzt im Sediment, das wir in ca. 10 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, lösten und ca. 15 s in einem Glas/Teflon-Potter homogenisierten. Nach dem Filtern über sechs Lagen Mull wurde die fertige Membran in Eis aufbewahrt. Der gesamte Präparationsvorgang ist in Abb. 3 im Detail dargestellt.

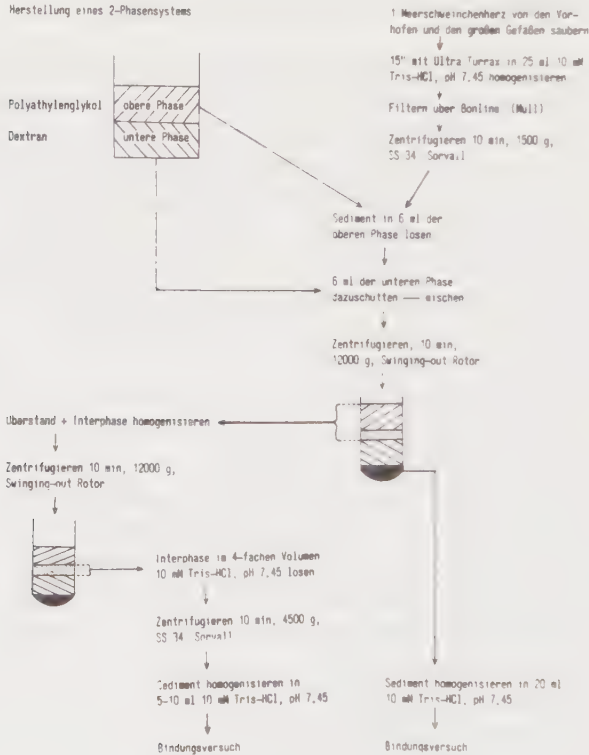


Abb. 4

Präparation von Herzmuskelzellmembranen (Dextran-Poly-äthylenglykol-Zweiphasensystem)

2.2.3 Membranpräparation, modifiziert nach Drummond und Severson (50)

- Membranpräparation für Bindungsstudien am beta-adrenergen Rezeptor und zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität (50)

Herz: Jeweils vier Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet, die Herzen rasch entnommen und in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das Blut zu entfernen. Die Herzen wurden dann in 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, sorgfältig von den Vorhöfen, dem Bindegewebe und den großen Gefäßen gesäubert und, nachdem das Feuchtgewicht bestimmt worden war, grob mit der Schere zerkleinert. Die Herzen wurden dann in ca. 80 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,45, 4°C, mit dem Ultraturrax 10 s lang bei Höchstgeschwindigkeit homogenisiert und anschließend über sechs Lagen Mull gefiltert. Das Homogenat wurde dann bei 1500 x g (Sorvall RC-5, Rotor SS 34, 3500 Upm) 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde, nachdem es jeweils während 30 s in einem vorgekühlten Glas/Teflon-Potter homogenisiert worden war, noch 2mal im gleichen Volumen des 10 mM Tris-Puffers pH 7,45 bei 1500 x g gewaschen. Der Überstand wurde jedesmal verworfen. Zum Schluß wurde das Sediment in eisgekühltem 10 mM Tris-HCl pH 7,45 gelöst, wobei das Volumen dem 8-10fachen Feuchtgewicht der Herzen entsprechen soll. Das Membrangemisch wurde nochmals mit dem Glas/Teflon-Potter homogenisiert und über sechs Lagen Mull gefiltert. Die fertige Membransuspension bewahrten wir, sofern nichts anderes angegeben ist, in Eis auf. Die nach Lowry et al. (116) bestimmte Proteinkonzentration lag immer im Bereich von 2-3 mg Protein/ml.

Lunge: Die Lungen der Meerschweinchen wurden nach dem Waschen in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung vom groben Bindegewebe sowie den großen Blut- und Bronchialgefäßen befreit und nach dem Zerkleinern mit dem Ultraturrax zusätzlich mit dem gekühlten Glas/Teflon-Potter ca. 30 s lang homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat über sechs Lagen Mull gefiltert. Die weiteren Präparationsschritte entsprechen genau denen am Herzen. Die Proteinkonzentration der fertigen Membransuspension lag ebenfalls im Bereich von 2-3 mg Protein/ml.

- Membranpräparation, angereichert durch Lithiumbromid zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität (50)

Vier Meerschweinchenherzen wurden rasch entnommen, in 4°C physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Vorhöfe, das Bindegewebe und die großen Gefäße sorgfältig entfernt. Anschließend wurden die in Würfel von ca. 0,5 cm geschnittenen Herzen in 75 ml gekühlter physiologischer Kochsalzlösung 10 s lang mit dem Ultraturrax zerkleinert, über sechs Lagen Mull gefiltert und dann 15 min mit 1500 x g bei 4°C zentrifugiert (Sorvall RC-5, Rotor SS 34, 3500 Upm). Das Sediment wurde in 75 ml 1 mM EGTA (Titriplex VI), gepuffert mit Tris-Base auf pH 7,45, und 2 mM Dithiothreitol (DTT) gelöst, mit dem Glas/Teflon-Potter homogenisiert und wieder 15 min bei 1500 x g im Rotor SS 34 zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in der gleichen Lösung nochmals 15 min bei 1500 x g gewaschen und das dann entstandene Sediment in 20 ml 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45 und 2 mM DTT von 4°C homogenisiert. Nach Zugabe von 20 ml 0,8 M Lithiumbromid in 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT, 4°C, wurde 45 min lang unter Eiskühlung gerührt und das Homogenat dann 20 min lang bei 1500 x g im Rotor SS 34 (Sorvall RC-5) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Sediment in 20 ml 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT und in 20 ml 0,8 M Lithiumbromid in 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT homogenisiert, bevor es wiederum bei 1500 x g im Rotor SS 34 20 min zentrifugiert wurde. Nach Aufnahme des Sediments in 75 ml 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT, wurde wieder im Rotor SS 34 20 min lang bei 1500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 40 ml 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT ein letztes Mal bei 1500 x g im Rotor SS 34 20 min lang gewaschen, der Überstand verworfen und das Sediment in 15 ml 1 mM EGTA/Tris-Puffer pH 7,45, 2 mM DTT homogenisiert. Nach dem Filtern über sechs Lagen Mull wurde die fertige Membransuspension in Eis aufbewahrt.

2.3 Bindungsexperimente mit radioaktiv markierten beta-adrenergen Antagonisten

Zur Durchführung der Bindungsversuche wurde ein radioaktiv markierter beta-adrenerger Antagonist mit 0,4-0,6 mg der frisch präparierten Membransuspension und - in Abhängigkeit von der Fragestellung - mit unmarkierten beta-adrenergen Agonisten bzw. Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 37°C inkubiert. Die dazu hergestellte radioaktive Ansatzlösung, die den markierten Liganden enthält, besteht aus 16 nM (-)-³H-Dihydroalprenolol bzw. 0,0875 nM ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol, 50 mM Tris-HCl pH 7,45 und 25 mM MgCl₂. 0,1 ml dieser radioaktiven Ansatzlösung wurde zu insgesamt 0,7 ml Aqua dest. allein oder zu Aqua dest. plus steigende Konzentrationen (10^{-10} M - 10^{-4} M) eines nicht markierten beta-adrenergen Antagonisten bzw. Agonisten pipettiert. Die Bindungsreaktion wurde durch die Membranzugabe gestartet, wobei das Einpipetieren der Membransuspension, das Durchmischen und das Einbringen des Röhrchens in das entsprechende Wasserbad 15 s in Anspruch nahmen; erst von diesem Zeitpunkt an wurde die jeweilige Inkubationszeit gemessen. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Auffüllen des Inkubationsröhrchens mit 10 ml eisgekühltem Aqua dest. gestoppt und der membran-gebundene Ligand vom freien Liganden durch rasche Vakuumfiltration (vgl. 2.4) getrennt. Die auf dem Filter befindliche, an Membranprotein gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationszählgerät (Betaszint BF 5000, Fa. Berthold) oder Gamma-Zählgerät (Gammaszint BF 5300, Fa. Berthold) gemessen. Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte wurden mindestens 3fach bestimmt und dann gemittelt.

2.3.1 Messung der Assoziationsreaktion

In Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von ca. 10 ml pipettiert man 0,1 ml radioaktive Ansatzlösung und Aqua dest. Durch Zugabe der Membransuspension wird die Reaktion gestartet und nach Ablauf verschiedener Inkubationszeiten im Wasserbad von z.B. 37°C durch Auffüllen der Röhrchen mit 10 ml eisgekühltem Aqua dest. und anschließende Vakuumfiltration gestoppt.

Beispiel: 0,005 ml (-)-³H-Dihydroalprenolol (1,6 Picomole)
0,095 ml Inkubationspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,45
25 mM MgCl₂

ergibt: 0,1 ml radioaktive Ansatzlösung
0,7 ml Aqua dest.
0,2 ml Membransuspension (0,4-0,6 mg Protein)

1,0 ml Gesamtvolumen

2.3.2 Messung der Dissoziationsreaktion

- Dissoziation durch Verdrängung mit dem jeweiligen nicht markierten Antagonisten

Die Assoziation wurde wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Nach ca. 10 min Inkubationszeit bei 37°C wurde (-)Alprenolol bzw. (±)Pindolol in einer Konzentration von 10⁻³ M hinzugefügt und weiter bei 37°C inkubiert. Der später zugefügte unmarkierte Ligand verdrängt bereits an den Membranrezeptor gebundenes (-)-³H-Dihydroalprenolol bzw. ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol von seinen Bindungsstellen. Dieser Vorgang wurde zu verschiedenen Zeiten durch Vakuumfiltration gestoppt und die membrangebundene Radioaktivität als Ausdruck des verbliebenen Anteils an gebundenem (-)-³H-Dihydroalprenolol gemessen.

- Dissoziation durch Verdünnung (1:100)

Zur Durchführung der Assoziation inkubierten wir 0,4-0,6 mg der üblichen Membransuspension mit 0,1 ml der im Beispiel näher definierten radioaktiven Ansatzlösung 15 min bei 37°C und stellten das Inkubationsröhrchen anschließend in Eis. Dann pipettierten wir 0,1 ml der so vorbereiteten Membran zu 9,9 ml einer Pufferlösung aus 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM $MgCl_2$, die in einem Wasserbad auf 37°C vorinkubiert worden ist. Die Dissoziationsreaktion wurde zu verschiedenen Zeiten durch rasche Vakuumfiltration gestoppt.

Beispiel: 0,02 ml (-)-³H-Dihydroalprenolol (6,8 Picomole)
0,08 ml Inkubationspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,45
25 mM $MgCl_2$

ergibt: 0,1 ml radioaktive Ansatzlösung
0,2 ml Membransuspension

0,3 ml Reaktionsvolumenzur Durchführung der Assoziation

nach

15 min: 0,1 ml Reaktionsvolumen zur Durchführung der Assoziation
9,9 ml Pufferlösung: 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45
2,5 mM $MgCl_2$

10 ml Gesamtvolumen

2.3.3 Konzentrationsabhängige Bindung

Die Bindung eines radioaktiv markierten beta-adrenergen Antagonisten, wie z.B. (-)-³H-Dihydroalprenolol oder ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol an den Betarezeptor wird durch gleichzeitige Inkubation mit einem unmarkierten Antagonisten oder Agonisten kompetitiv gehemmt. Wird der unmarkierte Ligand dem Inkubationsvolumen in steigender Konzentration zugesetzt und mißt man die Abnahme der membrangebundenen Radioaktivität, dann kann aus dem Kurvenverlauf die Dissoziationskonstante der unmarkierten beta-adrenergen Substanz ermittelt werden, voraus-

gesetzt natürlich, daß die Dissoziationskonstante des radioaktiv markierten Antagonisten bekannt ist. Besitzt der unmarkierte Antagonist dieselbe Affinität zum Betarezeptor wie der radioaktiv markierte Ligand, dann kann durch die Auftragung nach Scatchard sowohl die Dissoziationskonstante als auch die Gesamtzahl der Bindungsstellen errechnet werden. Zur Durchführung der konzentrationsabhängigen Bindung haben wir die radioaktive Ansatzlösung mit steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden (z.B. (-)Alprenolol 10^{-9} M - 10^{-4} M oder (+)Pindolol 10^{-10} M - 10^{-5} M), Aqua dest. und 0,4-0,6 mg frischer Membransuspension 10 min bzw. 30 min bei 37°C inkubiert.

Beispiel: 0,005 ml (-)- ^3H -Dihydroalprenolol (1,6 Picomole)
 0,095 ml Inkubationspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,45
 25 mM MgCl_2

ergibt: 0,1 ml radioaktive Ansatzlösung
 0,6 ml Aqua dest.
 0,1 ml (-)Alprenolol (10^{-9} M - 10^{-4} M)
 0,2 ml Membransuspension

1,0 ml Gesamtvolumen

2.4 Versuchsanordnung und Durchführung der Filtrationsmethode zur Isolierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes

Zur Trennung des membrangebundenen Liganden vom freien Liganden verwendeten wir die Filtrationsmethode. Mit diesem Verfahren kann man den Liganden-Rezeptor-Komplex rasch, d.h. in weniger als 30 s isolieren.

Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde über eine Saugflasche und eine Filtrationsanlage (Fa. Sartorius, Göttingen) ein Unterdruck erzeugt, der ausreichend war, um das Inkubationsmedium von den Zellmembranen zu trennen. Wir verwendeten Whatman Glasfaserfilter (GF/C; Durchmesser 2,5 cm) und spülten mit 20 ml eiskühlem Aqua dest. nach. Da in der abgesaugten Flüssigkeit

sigkeit, die in der Filtrations-Vakuumflasche gesammelt wurde, nach der Bestimmungsmethode von Lowry et al. (116) kein Protein nachgewiesen werden konnte, müssen das gesamte Membranprotein und die daran gebundenen Liganden auf dem Filterpapier zurückgeblieben sein. Nach dem Trocknen der Filter konnte die membrangebundene bzw. die an das Filterpapier gebundene Radioaktivität gemessen werden. Bei Bindungsversuchen mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden die Filter 20 min bei 100°C getrocknet, anschließend vorsichtig in Szintillationszählgefäße gelegt, die dann mit 10 ml Szintillationszählflüssigkeit (Insta Fluor, Fa. Packard, für wasserfreie Proben) aufgefüllt wurden. Die Radioaktivität wurde in "counts per minute" (cpm) in einem Beta-Zählgerät (Betaszint BF 5000, Fa. Berthold) gemessen. Bei Bindungsversuchen mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol genügte eine Trocknungszeit von 5 min bei 100°C . Die Filter wurden dann in Polypropylenröhrchen gesteckt und die Gamma-Strahlung im Gamma-Zählgerät (Gammaszint 5300, Fa. Berthold) gemessen und in counts per minute angegeben. Über Eichkurven konnte aus den cpm auf die absolute Menge der jeweiligen radioaktiv markierten Substanz geschlossen werden.

2.5 Durchführung der Messung der Adenylatzyklaseaktivität

Die Betarezeptor-gekoppelte Adenylatzyklase (Ac) kommt in Säugetierzellen an der Innenseite der Zellmembran vor (106). Das Enzym katalysiert folgende Reaktion (vereinfachte Darstellung):



Die Aktivität der Adenylatzyklase wird durch Messung des aus ATP gebildeten cAMP (zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat) bestimmt. Dabei ergeben sich folgende experimentelle Schwierigkeiten:

1. In der Plasmamembran befinden sich außerdem Enzyme, die

ebenfalls das ATP spalten (ATPasen), aber eine wesentlich höhere Aktivität als die Adenylatzyklase beim Abbau von ATP besitzen und somit das Substratangebot für die Adenylatzyklase herabsetzen. Die Substratkonzentration muß daher durch Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems konstant gehalten werden; dieses System besteht aus Kreatinphosphat und Kreatinphosphatkinase (CK):



2. Ein Teil des gebildeten cAMP wird sofort von Phosphodiesterasen gespalten. Um dennoch das entstandene radioaktiv markierte cAMP messen zu können, wird zum einen der Abbau durch Phosphodiesterasehemmer gehemmt; zum anderen verdünnten wir das gebildete radioaktive (= meßbare) cAMP mit einem hohen Überschuß an unmarkiertem cAMP.
3. Ein weiteres Problem stellt die Trennung des gebildeten cAMP vom ATP am Ende der Reaktion dar, das Salomon et al. (151) anhand eines säulenchromatographischen Verfahrens unter Verwendung eines Harz-Ionenaustauschers (Dowex AG 50-XW4) und von Aluminiumoxid lösten. Um das während der säulenchromatographischen Auftrennung verlorengegangene ^{32}P -cAMP ermitteln zu können, wird dem Reaktionsvolumen am Ende der Inkubationszeit eine genau definierte Menge des chemisch identischen ^3H -cAMP zugefügt. Nach dem säulenchromatographischen Trennungsvorgang wird die Radioaktivität von ^3H -cAMP und ^{32}P -cAMP gleichzeitig auf zwei Kanälen im Beta-Zählgerät gemessen. Da der einfach zu messende Verlust an ^3H -cAMP auch dem Verlust von ^{32}P -cAMP entspricht, kann die ursprünglich gebildete Menge an ^{32}P -cAMP daraus errechnet werden.

Das benutzte Verfahren zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität ist erstmals von Salomon et al. (151) angegeben und später von Glossmann (84) modifiziert worden, dessen Methode wir übernommen haben. Die Enzymaktivität wird dabei in einem 2stufigen Inkubationsverfahren gemessen. Zuerst inku-

bierten wir die Membransuspension, die nach der von Drummond und Severson (50) angegebenen Methode zur Durchführung von Bindungsstudien hergestellt wurde, zusammen mit Agonisten, Antagonisten und Gpp(NH)p 15 min bei 0°C vor. Anschließend fügten wir die Substanzen des Adenylatzyklaseassays hinzu und inkubierten das gesamte Reaktionsvolumen nochmals 15 min bei 37°C. Insgesamt wurden 60 µl eingesetzt, wobei das Reaktionsvolumen folgende Substanzen in der angegebenen Konzentration enthält: MgCl₂ 1 mM, Kreatinphosphat 8,7 mM, Kreatinphosphatkinase 50 U/ml, cAMP 1 mM, Isobutylmethylxanthin 5,4 mM, Tris-Puffer 50,5 mM pH 7,8, ³²P-ATP 0,3 mM (25-50 cpm/pMole). Die Konzentration der eingesetzten Membransuspension lag zwischen 80 und 160 µg Protein/60 µl. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von ATP und Na-Dodecylsulfat in einer Pufferlösung mit einem pH von 7,5. Zur Bestimmung der unspezifischen Radioaktivität wurde die Membransuspension durch Tris-HCl pH 7,5 ersetzt und die Proben im übrigen gleich behandelt. Die Aktivität der Adenylatzyklase wird in Nanomolen cAMP, das pro mg Protein in 10 min gebildet wird entsprechend den üblichen Literaturangaben, ausgedrückt.

3. EXPERIMENTELLE BEFUNDE UND DEREN BESPRECHUNG

3.1 Untersuchungen zur Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung

3.1.1 Darstellung unspezifischer Bindungsstellen

Beta-adrenerge Pharmaka, die an spezifische Rezeptoren gebunden sind, rufen über eine dadurch ausgelöste Aktivitätsänderung der Adenylatzyklase eine biologische Antwort hervor. Neben diesen spezifischen beta-adrenergen Rezeptoren gibt es aber auch Strukturen, die zwar eine gewisse Affinität zu beta-adrenergen Substanzen aufweisen, jedoch nicht mit dem Adenylatzyklasesystem gekoppelt sind. Derartige unspezifische Bindungsstellen findet man sowohl an Zellmembranen als auch an anorganischen Materialien, z.B. an Glasfaserfiltern. Wir haben deshalb die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an verschiedene Glasfaserfilter (Whatman GF/A, GF/B, GF/C, GF/F) in Abwesenheit von nativer Membransuspension gemessen. Dazu wurden 1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol mit 5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM MgCl_2 in einem Gesamtvolumen von 1 ml 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend rasch abfiltriert. Die an den verschiedenen Glasfaserfiltern gemessene Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol war unterschiedlich hoch, wobei am Filter GF/C am wenigsten Radioaktivität nachweisbar war (Tab. 1). Dieses Glasfaserfilter erscheint deshalb für Bindungsversuche am besten geeignet.

Filter	GF/A	GF/B	GF/C	GF/F
Maximale Bindung	490	2376	279	805

Tab. 1

Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an die verschiedenen Glasfaserfilter in Abwesenheit von Membransuspension, angegeben in counts per minute (cpm)

Zur Darstellung unspezifischer Bindungsstellen für (-)Alprenolol haben wir außerdem die Bindung von 1,6 Picomolen (-)-³H-Dihydroalprenolol an das Glasfaserfilter durch steigende Konzentrationen von (-)- und (+)Alprenolol gehemmt. Dieser konzentrationsabhängige Bindungsversuch wurde ebenfalls in Abwesenheit von nativer Membransuspension durchgeführt. Abb. 5 zeigt, daß (-)-³H-Dihydroalprenolol mit unterschiedlicher Affinität aber in keinem Fall stereospezifisch an unspezifische Strukturen gebunden werden kann, wenn man das Inkubationsmilieu verändert. Der Inkubationspuffer 1 wurde von Drummond et al. (50) für Bindungsversuche am beta-adrenergen Rezeptor angegeben und enthält 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM MgCl₂. Der Inkubationspuffer 2 mit 0,1 mM EGTA/Tris-HCl pH 7,45 und 0,2 mM DTT wurde für Versuche zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität benutzt. Da für eine Gegenüberstellung der Bindung beta-adrenerger Substanzen an den Betarezeptor und einer Änderung der Adenylatzyklaseaktivität durch beta-adrenerge Substanzen möglichst gleichartige Versuchsbedingungen bestehen sollten, versuchten wir, beide Bestimmungen an derselben Membranpräparation und mit denselben Pufferlösungen durchzuführen. Deshalb wollten wir auch an der durch Lithiumbromid angereicherten Membran für die Messung der Adenylatzyklaseaktivität und mit der dazu verwendeten Pufferlösung spezifische und unspezifische Bindungsstellen für (-)-³H-Dihydroalprenolol untersuchen. Da, wie Abb. 5 zeigt, die zur Messung der Enzymaktivität benutzte Inkubationspufferlösung 2 die Zahl der unspezifischen Bindungsstellen und deren Affinität gegenüber Alprenolol deutlich erhöht, scheint dieses Milieu für Bindungsstudien mit beta-adrenergen Substanzen weniger geeignet zu sein. In weiteren Experimenten ließ sich zeigen, daß die Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an Glasfaserfilter GF/C z.B. durch steigende Spülvolumina vermindert werden kann (Abb. 6). Wir inkubierten dazu 1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol mit 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM MgCl₂ 10 min bei 37°C (in Abwesenheit von nativer Membransuspension) und spülten beim Filtrationsvorgang mit steigenden Volumina eisgekühltem Aqua dest. nach.

Nach den beschriebenen Bindungsexperimenten am Glasfaserfilter GF/C stellt sich die unspezifische Bindung beta-adrenerger Substanzen folgendermaßen dar: Die unspezifische Bindung läuft schnell ab, da auch hier der gesamte Filtrationsvorgang, währenddessen sich das $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an das Filter bindet, weniger als 30 s dauert; sie ist reversibel, da die am Glasfaserfilter gebundene Radioaktivität durch das im Anschluß an den Filtrationsvorgang eingesetzte steigende Spülvolumen reduziert wird. Die Affinität von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol zum Glasfaserfilter kann in Abhängigkeit vom Inkubationsmilieu variiert werden. Eine Stereospezifität dagegen ist an den unspezifischen Bindungsstellen nicht nachweisbar.

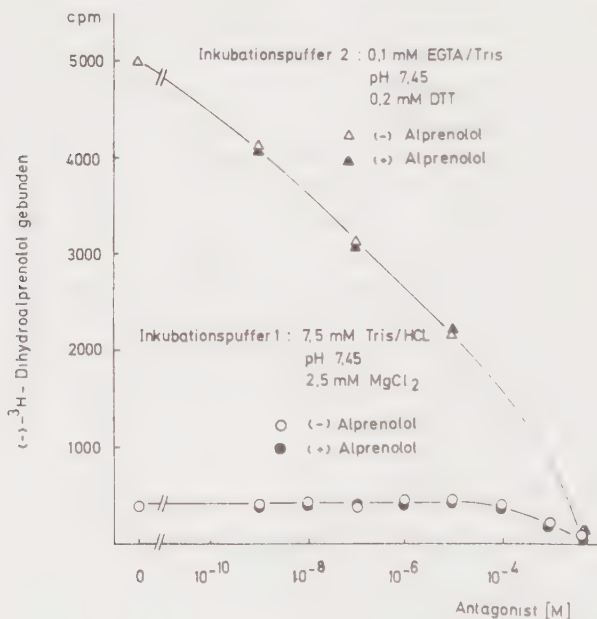


Abb. 5

Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an das Glasfaserfilter GF/C durch steigende Konzentrationen von $(-)$ - und $(+)$ -Alprenolol bei Verwendung verschiedener Pufferlösungen in Abwesenheit eines Membranproteins

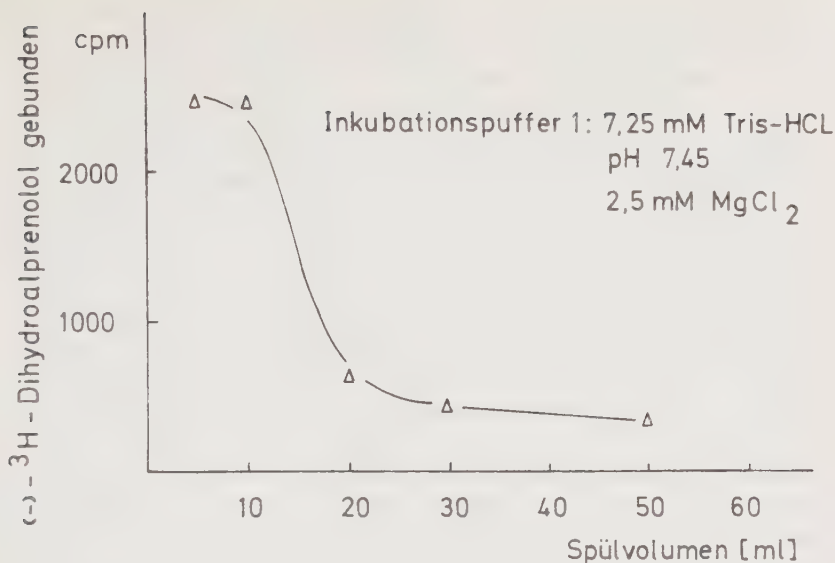


Abb. 6

Verminderung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an das Glasfaserfilter GF/C durch verschiedene Spülvolumina

3.1.2 Stereospezifität als Kriterium zur Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung

Aus pharmakologischen Untersuchungen weiß man, daß zum Nachweis einer spezifischen Pharmakon-Betarezeptor-Wirkung ein stereospezifisches Bindungsverhalten gefordert werden muß, da bei in vivo-Untersuchungen (-)isomere Formen beta-adrenerger Substanzen einen signifikant höheren biologischen Effekt als (+)isomere Formen ausgelöst haben. Es soll nun anhand verschiedener Experimente untersucht werden, ob die Stereospezifität tatsächlich als hinreichendes Kriterium zur Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung benutzt werden kann.

Wir stellten dazu eine Membransuspension von Meerschweinchen-

herzen nach dem von Drummond und Severson (50) beschriebenen Verfahren für Bindungsstudien am beta-adrenergen Rezeptor her (vgl. 2.2.3). Anschließend wurde die Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an diese Membransuspension durch steigende Konzentrationen von (-)- und (+)Alprenolol gehemmt (Abb. 7). Man erkennt deutlich, daß (+)Alprenolol die Bindung des markierten Liganden um etwa den Faktor 100 schlechter hemmt als die linksdrehende Form. Dies gilt bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M. Bei noch höheren Konzentrationen des unmarkierten Betablockers ist die Wirkung beider isomeren Formen wieder identisch. Wenn nun ein stereospezifisches Bindungsverhalten beta-adrenerger Pharmaka spezifische Betarezeptoren nachweist, dann ist anzunehmen, daß sich das in Gegenwart von $> 10^{-5}$ M Alprenolol noch meßbare (-)-³H-Dihydroalprenolol an unspezifische Strukturen der Membran bindet. Dieser Anteil der unspezifischen Bindung ist im Vergleich zur Bindung von anderen Liganden, z.B. Ouabain an Herzmuskelzellmembranen (52), sehr hoch.

Da anzunehmen ist, daß der spezifische Betarezeptor einem Proteinmolekül entspricht und auf äußere Einflüsse empfindlicher reagiert als unspezifische Strukturen, die ebenfalls beta-adrenerge Pharmaka binden, haben wir den Einfluß der Temperatur auf das stereospezifische Bindungsverhalten untersucht. Wir haben dazu eine Membransuspension von Meerschweinchenherzen, die nach der von Drummond und Severson (50) beschriebenen Methode für Bindungsstudien (vgl. 2.2.3) präpariert wurde, in einem Wasserbad von 37°C erhitzt. Zu verschiedenen Zeiten wurde dann an dieser vorinkubierten Membransuspension die Bindung von 1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol und parallel dazu der in Gegenwart von 10^{-5} M Alprenolol noch gebundene Anteil von 1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol gemessen (Abb. 8). Unter diesen Bedingungen wird immer weniger (-)-³H-Dihydroalprenolol maximal gebunden, je länger man die Membran bei 37°C inkubiert, bis nach 23 h insgesamt nur noch soviel gebunden wird wie ursprünglich in Gegenwart von 10^{-5} M Alprenolol. Im Gegensatz dazu bleibt diejenige Bindungskapazität der Membransuspension, die bei Zugabe von 10^{-5} M Alprenolol gemessen wird, während der Hitzedenaturie-

rung über 23 h konstant. An der frisch zubereiteten Membransuspension konnten wir, wie Abb. 7 zeigt, ein stereospezifisches Bindungsverhalten von Alprenolol nachweisen. An der 23 h lang bei 37°C erhitzten Membran war dagegen bei einem Konzentrationsabhängigen Bindungsexperiment mit (-)- und (+)Alprenolol keine Stereospezifität nachweisbar (Abb. 9). Eine Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an diese Membran gelang dabei überhaupt erst ab einer Konzentration von 10⁻⁵ M Alprenolol. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte der mit demselben Inkubationspuffer durchgeführte Bindungsversuch an sicher unspezifischen Bindungsstellen, d.h. an Glasfaserfiltern GF/C in Abwesenheit von nativer Membransuspension (Abb. 5, untere Kurve).

Um den Einfluß der Temperatur auf die Anzahl der spezifischen Rezeptoren bzw. auf deren Affinität zu untersuchen, haben wir einen konzentrationsabhängigen Bindungsversuch im Äquilibrium durchgeführt: 1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol und steigende Konzentrationen (-)Alprenolol wurden einmal mit einer frischen Membransuspension und dann mit einer während 8 h bei 37°C erhitzten Membransuspension 10 min bei 37°C inkubiert. Die nach der Methode von Scatchard (152) aufgetragenen Ergebnisse (Abb. 10), wobei die unspezifische Bindung in Gegenwart von 10⁻⁵ M Alprenolol gemessen wurde, zeigen, daß die Dissoziationskonstante von (-)Alprenolol gegenüber beiden Membranen mit 7 x 10⁻⁹ M gleich bleibt; die Bindungskapazität dieser hochaffinen Bindungsstelle hingegen, die bei der frischen Membransuspension 0,15 Picomole/mg Protein beträgt, verringert sich auf 0,06 Picomole/mg Protein, wenn man die gleiche Membransuspension 8 h lang bei 37°C inkubiert.

Anhand dieser Versuche ist die Abgrenzung der unspezifischen Bindung experimentell begründbar: Die Stereospezifität ist dabei das wichtigste Kriterium und hinreichend zum Nachweis spezifischer beta-adrenerger Bindungsstellen. Die danach bestimmte unspezifische Bindung entspricht der Bindung an eine hitzedenaturierte Membran und beträgt ca. 50 % der Gesamtbindung. Die spezifische Bindung an beta-adrenergen Rezeptoren liegt im Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰ M bis 10⁻⁵ M Alprenolol.

Analoge Bindungsversuche wurden mit dem gleichen Ergebnis am Lungengewebe von Meerschweinchen durchgeführt, so daß auch hier das stereospezifische Bindungsvermögen der Bindungsstellen als Beweis für ihre Spezifität angesehen werden kann.

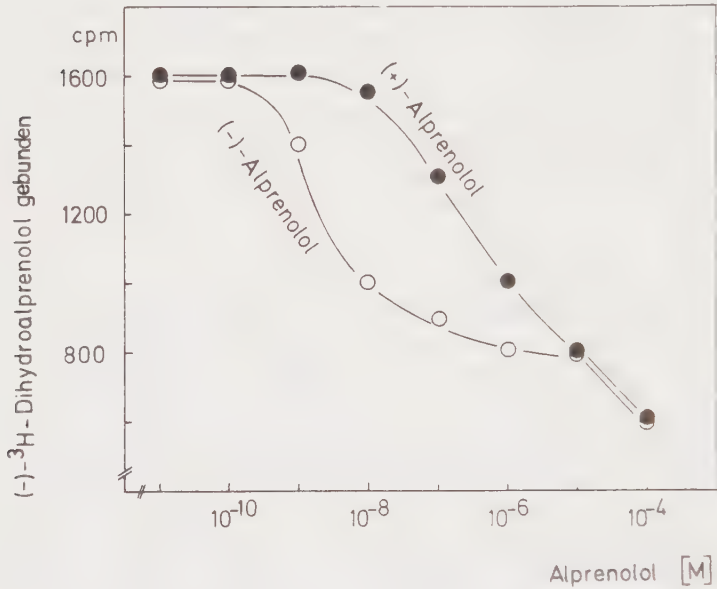


Abb. 7

Stereospezifische Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol durch (-)- und (+)Alprenolol an die Meerschweinchenherzmuskelmembran (Membranpräparation modifiziert nach Drummond und Severson (50); vgl. 2.2.3)

Ca. 0,5 mg Membransuspension wurden mit 1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl₂, Aqua dest. und steigenden Konzentrationen von (-)- und (+)-Alprenolol 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch gefiltert.

○ — ○ (-)Alprenolol
● — ● (+)Alprenolol

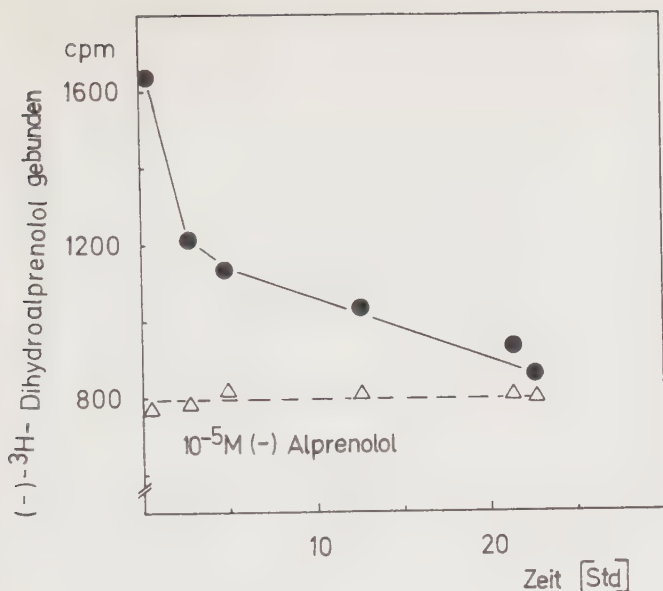


Abb. 8

Bestimmung der maximalen und unspezifischen Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an einer bei 37°C inkubierten Membran in Abhängigkeit von der Zeit

Eine nach Drummond und Severson (50) modifizierte Präparation von Meerschweinchenherzmuskelmembran (vgl. 2.2.3) wurde bei 37°C erhitzt. Zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurden die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol und parallel dazu die Hemmung dieser Bindung durch 10^{-5}M $(-)\text{Alprenolol}$ gemessen. Dazu wurden 0,45 mg Membransuspension mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 , Aqua dest. und entsprechend 10^{-5}M $(-)\text{Alprenolol}$ 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch gefiltert.

- Maximale Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol
- △---△ Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol in Gegenwart von 10^{-5}M $(-)\text{Alprenolol}$
(= unspezifische Bindung)

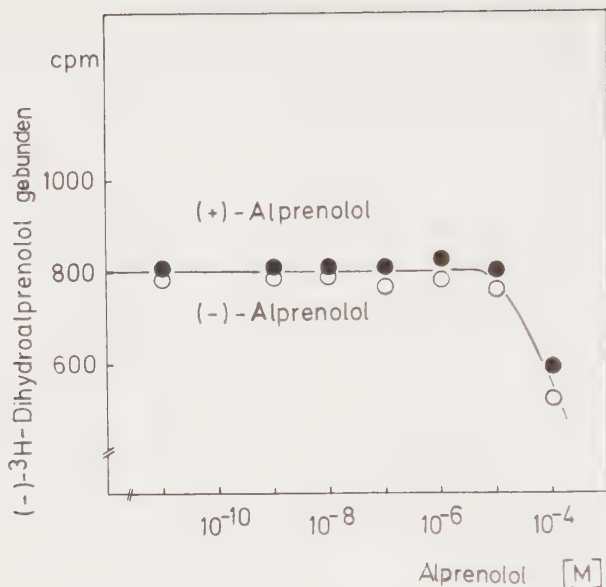


Abb. 9

Untersuchung der stereospezifischen Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an einer hitzedenaturierten Membranpräparation

Eine nach Drummond und Severson (50) modifizierte Präparation von Meerschweinchenherzmuskelmembran bewährten wir 23 h lang bei 37°C auf. Ca. 0,5 mg dieser denaturierten Membran wurden mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 , Aqua dest. und steigenden Konzentrationen von $(-)$ - und $(+)$ -Alprenolol 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch filtriert. Das gesamte Inkubationsvolumen war 1,0 ml.

○ — ○ $(-)$ -Alprenolol

● — ● $(+)$ -Alprenolol

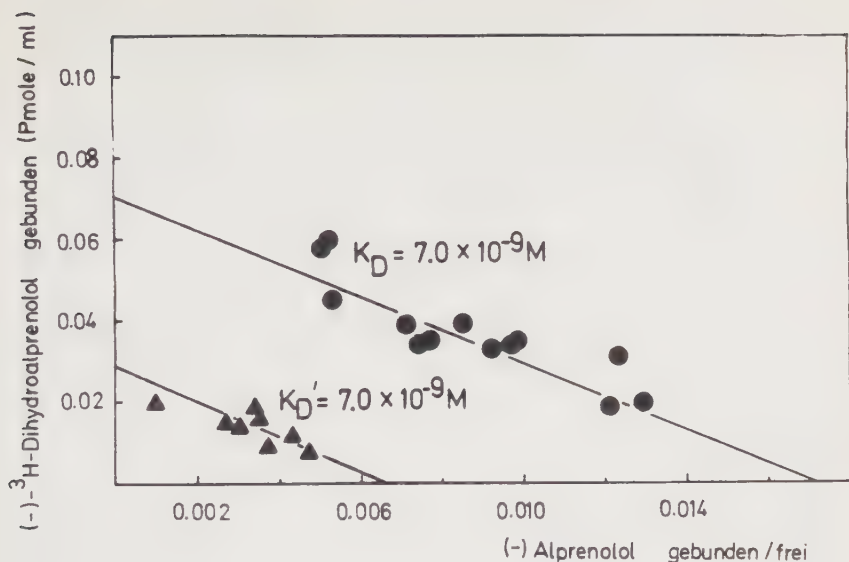


Abb. 10

Verlust spezifischer Bindungsstellen für (-)-³H-Dihydroalprenolol durch Inkubation der Membran bei 37°C während 8 h

Eine nach Drummond und Severson (50) modifizierte Präparation von Meerschweinchenherzmuskelmembranen wurde sofort und nach 8stündiger Inkubation bei 37°C mit 1,6 Picomolen (-)-³H-Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl₂, Aqua dest. und steigenden Konzentrationen von (-)- und (+)Alprenolol 10 min bei 37°C inkubiert. Die Auftragung nach Scatchard (152) zeigt eine gleichbleibende Dissoziationskonstante ($K_D = 7 \times 10^{-9} M$) und einen Verlust an Bindungsstellen durch Erhitzen der Membransuspension.

Bindungskapazität der frischen Membransuspension: 0,15 Picomole/mg Protein
Bindungskapazität der erhitzten Membransuspension: 0,06 Picomole/mg Protein

- — ● frische Membransuspension
- ▲ — ▲ Membransuspension 8 h bei 37°C vorinkubiert

3.2 Spezifische Bindungsstellen für (-)-³H-Dihydroalprenolol und deren Stabilität an verschiedenen Membranpräparationen

- a) Nach Drummond und Severson (50) modifizierte Membranpräparation für Bindungsstudien am beta-adrenergen Rezeptor und zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität

An der nach Drummond und Severson (50) modifizierten und in 2.2.3 beschriebenen Membranpräparation von Meerschweinchenherzen haben wir bereits ein stereospezifisches Bindungsverhalten von Alprenolol im Konzentrationsbereich von 10^{-10} bis 10^{-5} M (Abb. 7) und somit spezifische Bindungsstellen für (-)-³H-Dihydroalprenolol nachgewiesen. Um auszuschließen, daß die Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an die Membransuspension durch steigende Konzentrationen von (-)- und (+)Alprenolol in Wirklichkeit durch eine Abnahme von spezifischen Bindungsstellen vorgetäuscht wird, haben wir am Ende des Versuchs (nach ca. 2 h) nochmals die Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an die Membransuspension in Abwesenheit eines unmarkierten Betablockers gemessen. Dabei hatte die maximale membrangebundene Radioaktivität im Vergleich zum Beginn des Experimentes nur um ca. 5 % abgenommen; die Bindungsstellen für Betablocker zeigen an dieser Membransuspension somit eine ausreichende Stabilität. Die noch nicht zur Bindungsreaktion eingesetzten Membransuspensionen wurden während dieser Versuche in Eis aufbewahrt.

Die gleichen Versuche haben wir auch an der in 2.2.3 beschriebenen Membransuspension von Meerschweinchenlungengewebe durchgeführt. Die Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol wurde auch hier durch (-)Alprenolol im Konzentrationsbereich von 10^{-10} bis 10^{-5} M um fast den Faktor 100 stärker gehemmt als durch (+)Alprenolol (Abb. 11). Da der Verlust an Bindungsstellen bei Versuchsende kleiner war als 10 %, besteht auch an der so präparierten Membransuspension von Meerschweinchenlungengewebe eine ausreichende Stabilität beta-adrenerger Rezeptoren.

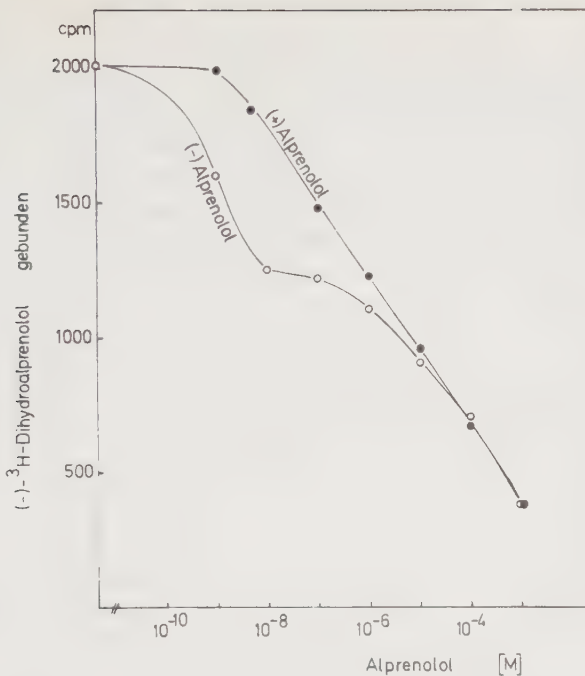


Abb. 11

Stereospezifische Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol am Meerschweinchenlungenengewebe (Membranpräparation modifiziert nach Drummond und Severson (50); vgl. 2.2.3)

0,26 mg Membransuspension wurden mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 , Aqua dest. und steigenden Konzentrationen $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol (Gesamtvolumen 1,0 ml) 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch gefiltert.

- b) Nach Drummond und Severson modifizierte Membranpräparation, angereichert durch Lithiumbromid, zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität (50)

Zur Herstellung von Meerschweinchenherzmuskelmembranen benutzten wir auch das nach Drummond und Severson (50) zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität modifizierte Präparationsverfahren mit

Anreicherung durch Lithiumbromid; dabei werden EGTA und Di-thiothreitol (DTT) im Präparationspuffer gelöst. Bei Bin-dungsversuchen mit beta-adrenergen Pharmaka an einer derar-tigen Membransuspension konnten wir keine stereospezifische Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol (Abb. 12) und somit keine spezifischen Be-tarezeptoren nachweisen. Diese Membranpräparation ist des-halb für Bindungsstudien am beta-adrenergen Rezeptor ungeeig-net.

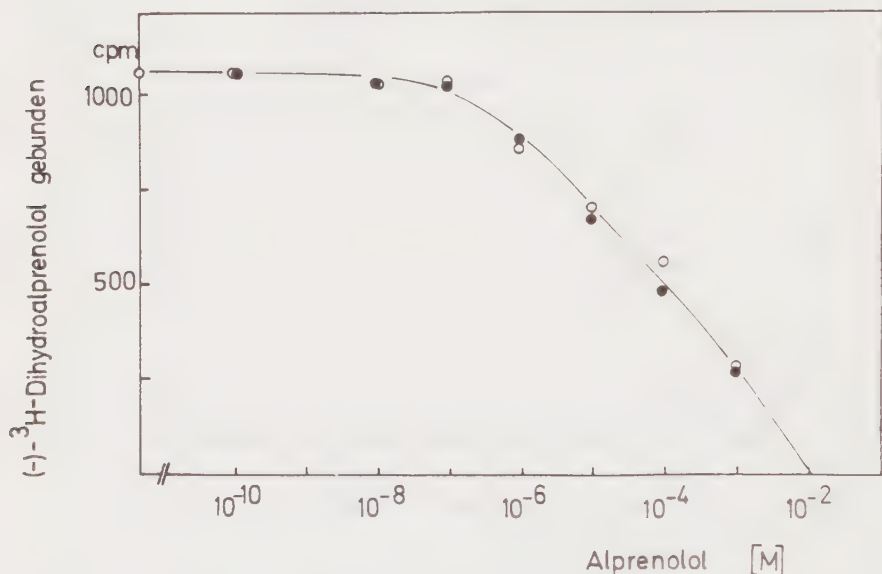


Abb. 12

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol an der nach Drummond und Severson (50) modifizierte Membranpräparation mit Anreicherung durch Lithiumbromid (Meerschweinchenherzmuskelgewebe)

0,42 mg Membransuspension wurden sofort nach Fertigstellung mit 1,6 Pico-molen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 , Aqua dest. und steigenden Konzentrationen $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch gefil-tert.

o—o $(-)$ Alprenolol
 ●—● $(+)$ Alprenolol

c) Membranpräparation nach Alexander et al. (7)

Die Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen wurde nach dem in 2.2.1 beschriebenen Verfahren hergestellt. Unmittelbar nach deren Fertigstellung und zu den in Abb. 13 auf der Abszisse angegebenen Zeiten wurde die Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an diese Membransuspension gemessen. Die nicht zu einer Bindungsreaktion im Inkubationsvolumen eingesetzte Membransuspension wurde bei 4°C aufbewahrt. Das Experiment zeigt, daß sich die Bindungskapazität für $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol innerhalb von 30 min um 30 % und innerhalb von 1 h um 46 % vermindert hat. Wegen dieser starken Abnahme von Bindungsstellen für $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol innerhalb kurzer Zeit eignet sich diese Membransuspension nicht für Bindungsversuche am beta-adrenergen Rezeptor.

d) Membranpräparation unter Verwendung eines Dextran-Polyäthylenglykol-Zweiphasensystems (27)

Wir präparierten Meerschweinchenherzmuskelgewebe nach der in 2.2.2 beschriebenen Methode und führten die Bindungsversuche mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol sowohl an der aus der Interphase als auch an der aus dem Sediment isolierten Proteinsuspension durch. An dem aus der Interphase gewonnenen Material ließ sich die Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol stereospezifisch durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} M - 10^{-6} M hemmen (Abb. 14 A). Die somit an dieser Membranpräparation nachgewiesenen spezifischen beta-adrenergen Bindungsstellen wiesen außerdem eine ausreichende Stabilität auf (Verlust der Bindungsstellen unter 10 % innerhalb 2 h). Am Sediment konnten wir dagegen keine signifikante Stereospezifität nachweisen (Abb. 14 B).

Die in der Interphase isolierte Membran wies im Vergleich zu der nach Drummond und Severson (50) für Bindungsstudien und zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität modifizierten Mem-

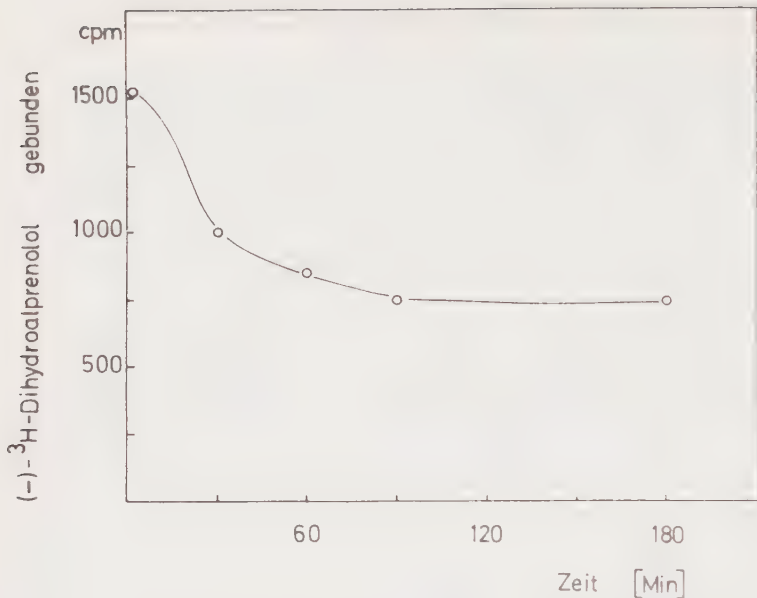
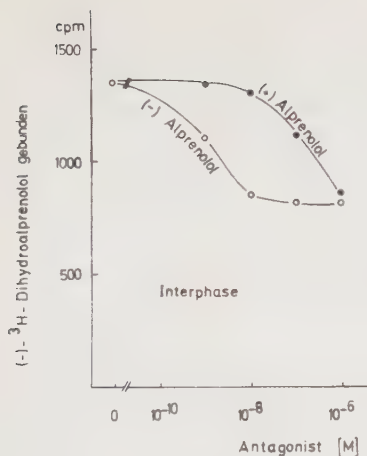


Abb. 13

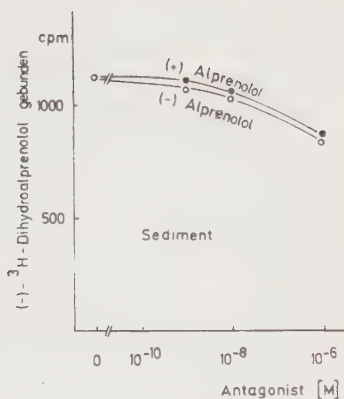
Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an die nach Alexander et al. (7) präparierte Meerschweinchenherzmuskelmembran

Nach Fertigstellung der nach Alexander et al. (7) präparierten Membransuspension von Meerschweinchenherzen wurden zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten jeweils 0,45 mg Membransuspension mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 1,5 mM MgCl₂ und Aqua dest. 10 min bei 37°C inkubiert.

branpräparation weder eine stärkere Anreicherung spezifischer beta-adrenerger Bindungsstellen noch eine bessere Stabilität dieser Bindungsstellen auf. Da die anhand eines Dextran-Poly-äthylenglykol-Zweiphasensystems hergestellte Membransuspension jedoch wesentlich arbeitsaufwendiger ist, haben wir die nach Drummond und Severson (50) für Bindungsstudien und zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität modifizierte Membranpräparation ohne Anreicherung durch Lithiumbromid für unsere weiteren Bindungsstudien verwendet.



A: Interphase



B: Sediment

Abb. 14

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ -Alprenolol an der Membranpräparation von Meerschweinchenherzmuskelgewebe unter Verwendung eines Dextran-Polyäthylenglykol-Zweiphasensystems (27)

0,45 mg Protein (Interphase) bzw. 0,32 mg Protein (Sediment) wurden jeweils mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 , Aqua dest. und steigenden Konzentrationen von $(-)$ - und $(+)$ -Alprenolol (Gesamtvolumen 1 ml) 10 min bei 37°C inkubiert und dann rasch gefiltert.

3.3 Kinetische Bindungsexperimente

3.3.1 Assoziationsreaktion

Wir haben die Assoziationsreaktion von 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Herzmuskelmembranen (Abb. 15) und Lungengewebe (Abb. 16) von Meerschweinchen sowie die Assoziationsreaktion von 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Meerschweinchenherzmuskelmembranen (Abb. 17) gemessen (vgl. 2.3.1). Unter unseren Versuchsbedingungen erhielten wir beim Bindungsversuch mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol nach 10 min ein initiales Bindungsmaximum, das nach 30 min Inkubationszeit in ein niedrigeres Plateau übergang. Die Reaktion mit

(-)-³H-Dihydroalprenolol zeigte bereits nach ca. 3 min dieses Bindungsmaximum und nach 6 min das Plateau. Bei allen unseren Assoziationsversuchen haben wir zu den angegebenen Zeiten in mehr oder weniger deutlicher Ausprägung dieses initiale Bindungsmaximum erhalten. Für dieses Phänomen, das auch von Lucas und Borchaert (117) beschrieben wurde, ergeben sich zwei verschiedene Interpretationsmöglichkeiten:

- a) Es könnte sich um einen unspezifischen Membraneffekt handeln.
- b) Das initiale Bindungsmaximum und das sich später ausbildende Plateau könnten aber auch Ausdruck einer gegenseitigen Rezeptorbeeinflussung im Sinne einer negativen Kooperativität sein, d.h., daß die Affinität der Rezeptoren zu den spezifischen Liganden bei zunehmender Rezeptorbesetzung abnimmt (46, 48). Das Äquilibrium liegt dabei im Plateaubereich, d.h. im stabilen Gleichgewichtszustand zwischen k_{+1} und k_{-1} .

Da wir anhand von Bindungsstudien am beta-adrenergen Rezeptor eine negative Kooperativität nachweisen konnten (vgl. 3.3.3), erscheint uns diese Erklärung für das initiale Bindungsmaximum am wahrscheinlichsten. Wir inkubierten bei unseren Bindungsversuchen mit (-)-³H-Dihydroalprenolol mindestens 10 min bei 37°C und bei Bindungsversuchen mit ¹²⁵J-Hydroxybenzylpindolol 30 min bei 37°C. Eine stereospezifische Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol durch Alprenolol konnte sowohl nach einer Inkubationszeit von 3 min als auch von 10 min bei 37°C nachgewiesen werden.

Die Assoziationsversuche zeigen außerdem, daß die Bindung beta-adrenerger Antagonisten an die Membransuspension so schnell abläuft, daß die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} aus dem Kurvenverlauf nicht berechnet werden kann.

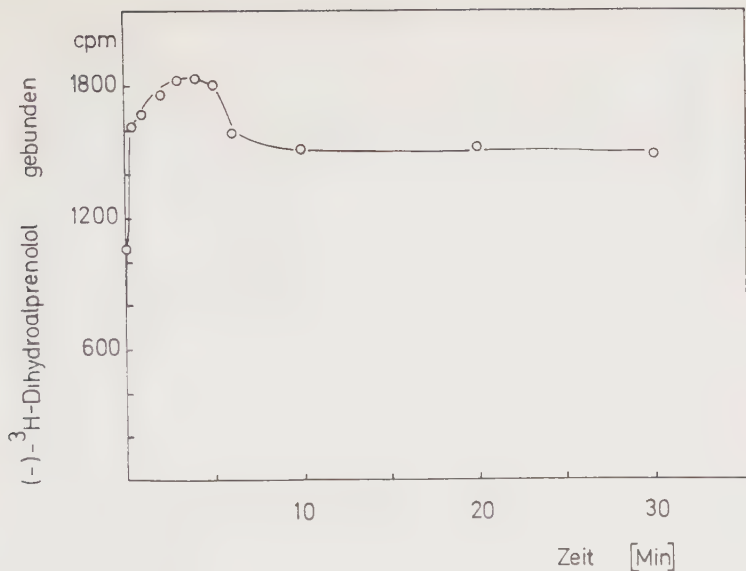


Abb. 15

Assoziationsreaktion von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Herzmuskellmembranen

0,5 mg Herzmuskellmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 und Aqua dest. in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt.

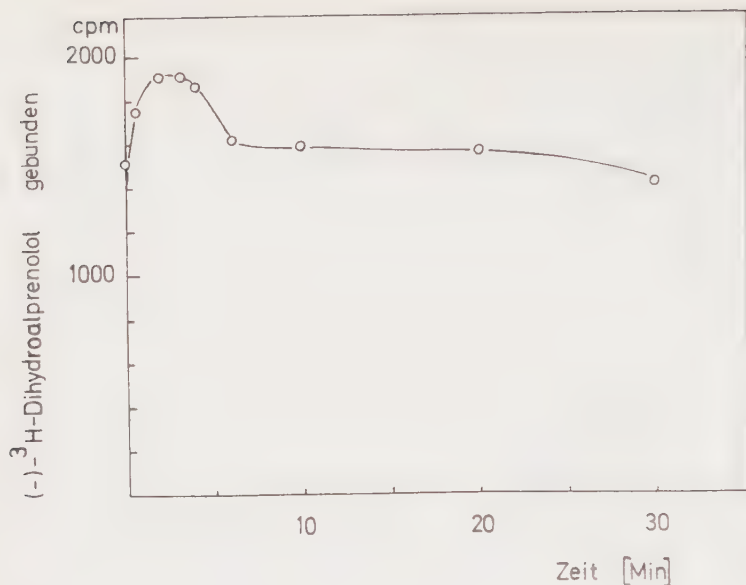


Abb. 16

Assoziationsreaktion von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Lungengewebe
 0,3 mg Lungengewebe von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 1,6 Picomolen $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 und Aqua dest. (Gesamtvolumen 1,0 ml) bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt.

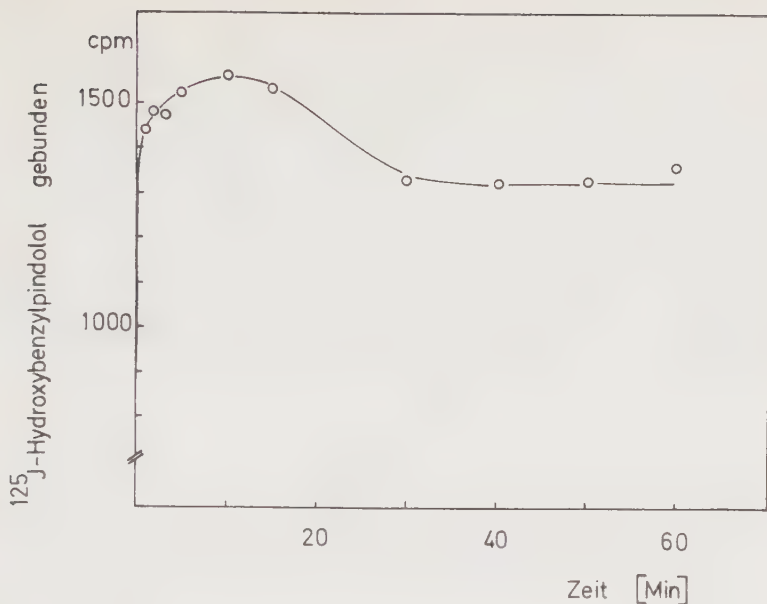


Abb. 17

Assoziationsreaktion von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Herzmuskellmembranen

0,46 mg Herzmuskellmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 und Aqua dest. (Gesamtvolumen 1,0 ml) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeiten durch rasche Filtration gestoppt.

3.3.2 Dissoziationsreaktion

Wir haben bereits an den Betarezeptor gebundenes ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol durch Zugabe einer hohen Konzentration von ($\pm$)Pindolol aus dieser spezifischen Bindung verdrängt. Das zu verschiedenen Zeiten noch an den Rezeptor spezifisch gebundene ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol wurde gemessen und bei halb-logarithmischer Auftragung in Prozent angegeben (Abb. 18). 100 % entsprechen der Besetzung der spezifischen Bindungsstellen mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol unmittelbar vor Zugabe des unmarkierten Antagonisten. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante wird nach der Formel

$$k_{-1} = \frac{\ln \frac{2}{1}}{t \frac{1}{2}}$$

ermittelt.

Wir erhielten dabei nach Abb. 18 für ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol eine Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} von $5,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

3.3.3 Untersuchungen über beta-adrenerge Rezeptorinteraktionen

De Meyts (46) konnte durch Untersuchungen der Dissoziationskinetik eine negativ kooperative Wechselwirkung zwischen den Insulinrezeptoren an menschlichen Lymphozytenzellkulturen nachweisen. Er ging dabei von der Hypothese aus, daß die Abnahme der Affinität bei einer negativen Kooperativität mindestens teilweise auf einer beschleunigten Dissoziationsgeschwindigkeit beruht (48, 111). Wir haben die von De Meyts beschriebenen Verdünnungsexperimente am Betarezeptor von Meerschweinchenherzmuskelmembranen (Abb. 19) und Meerschweinchenlungenewebe (Abb. 20) durchgeführt. Dazu inkubierten wir 1,64 mg Membranprotein mit $6,4 \times 10^{-9} \text{ M}$ $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml 15 min bei 37°C . Anschließend haben wir je 0,1 ml des beschriebenen Ansatzvolumens erstens in 9,9 ml Pufferlösung (7,5 mM Tris-HCl, pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2)

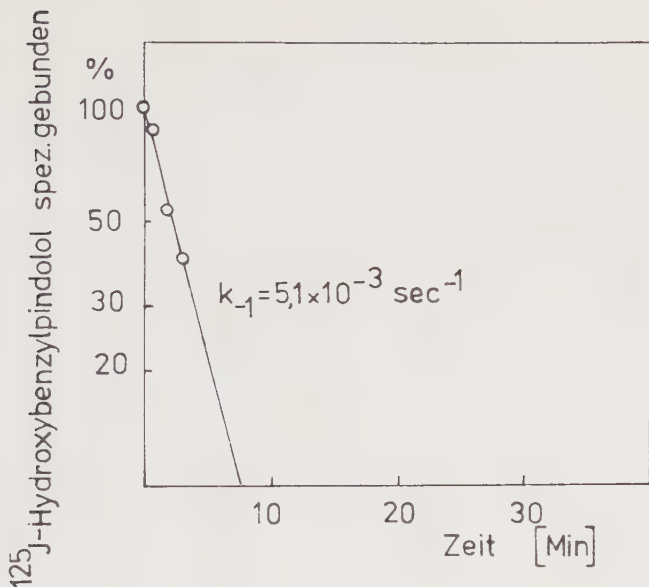


Abb. 18

Dissoziation von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol von Herzmuskelmembranen

0,46 mg Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2 und Aqua dest. in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml bei 37°C bis zum Äquilibrium inkubiert. Dann haben wir 0,1 ml 10^{-3}M ($\pm$)Pindolol hinzugegeben und die Reaktion zu den angegebenen Zeiten durch rasche Vakuumfiltration unterbrochen. Vom insgesamt gebundenen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol wurde jeweils die unspezifische Bindung abgezogen und der spezifische Anteil in Prozent angegeben (100 % entspricht der spezifischen membrangebundenen Radioaktivität vor Zugabe des unmarkierten ($\pm$)Pindolols).

und zweitens in 9,9 ml Pufferlösung plus 10^{-6} M (-)Alprenolol eingebracht. Die durch die Verdünnung von jeweils 1:100 hervorgerufene Dissoziation bereits gebundenen (-)- ^3H -Dihydroalprenolols vom Rezeptor wurde zu den auf der Abszisse angegebenen Zeiten durch rasche Vakuumfiltration gestoppt und die prozentuale membrangebundene spezifische Radioaktivität logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die unmittelbar nach der Verdünnung gemessene spezifisch gebundene Radioaktivität entspricht 100 %. Die graphischen Darstellungen (Abb. 19 und 20) zeigen, daß beim Verdünnungsexperiment mit 10^{-6} M (-)Alprenolol im Inkubationsvolumen ein Teil des bereits spezifisch gebundenen (-)- ^3H -Dihydroalprenolols schneller und von einer größeren Anzahl von Rezeptoren abdiffundiert als beim Verdünnungsversuch ohne den unmarkierten Liganden. Dieses Ergebnis bestätigt eine negativ kooperative Wechselwirkung zwischen den beta-adrenergen Rezeptoren, da unter sonst gleichen Versuchsbedingungen bei der Besetzung einer größeren Anzahl spezifischer Bindungsstellen durch die Zugabe von z.B. unmarkiertem (-)Alprenolol die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} zunimmt.

Durch die Verdünnung stellt sich nach dem Massenwirkungsgesetz ein neues Gleichgewicht ein, wobei die Anzahl der mit einem Betablocker besetzten spezifischen Rezeptoren kontinuierlich abnimmt. Deshalb muß bei einem negativ kooperativen Verhalten der Rezeptoren auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} kontinuierlich abnehmen. Das führt zu einer zunehmend langsameren Abdissoziation des markierten Liganden vom Rezeptor, bis das neue Gleichgewicht erreicht ist, was auch aus dem Kurvenverlauf zu ersehen ist. Für die unmittelbar nach der Verdünnung bestehende Rezeptorbesetzung läßt sich ein Annäherungswert für k_{-1} unter den zwei verschiedenen Versuchsbedingungen ermitteln, wenn man unter Verwendung der Abbildungen 19 und 20 durch den Zeitpunkt 0 eine Gerade tangential an die Kurvenverläufe anlegt. Die Halbwertszeit $t_{\frac{1}{2}}$ kann dann auf der Abszisse abgelesen und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} anhand der Formel

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t \frac{1}{2}}$$

errechnet werden (Tab. 2).

	k_{-1} am Herzen s^{-1}	k_{-1} an der Lunge s^{-1}
1:100 Verdünnung ohne Zugabe von (-)Alprenolol	$1,8 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-2}$
1:100 Verdünnung mit Zugabe von $10^{-6}M$ (-)Alprenolol	$5,77 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-2}$

Tab. 2

Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} , errechnet anhand der Abbildungen 19 und 20

Die beschleunigte Abdissoziation von $(-)^{-3}H$ -Dihydroalprenolol in Gegenwart von $10^{-6}M$ (-)Alprenolol im Verdünnungspuffer könnte nun durch eine zu niedrig gewählte Verdünnung vorgetäuscht werden. Dabei würde in Abwesenheit von unmarkiertem (-)Alprenolol bereits vom Rezeptor abdissoziiertes $(-)^{-3}H$ -Dihydroalprenolol erneut an die Membran gebunden werden (Rebindung), wodurch insgesamt eine zu geringe Abdissoziation gemessen würde. Zum Ausschluß dieses Effektes (110) haben wir das Ansatzvolumen aus $6,4 \times 10^{-9}M$ $(-)^{-3}H$ -Dihydroalprenolol und 1,64 mg Membransuspension nach der Inkubation (15 min bei $37^{\circ}C$) geteilt. Die eine Hälfte haben wir mit Inkubationspuffer, die andere Hälfte mit nativer Membransuspension zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt. Abbildung 21 zeigt, daß keine der aufgetragenen Verdünnungskurven durch die Zugabe zusätzlicher nativer Membransuspension verändert wird. Würde in Abwesenheit von $10^{-6}M$ (-)Alprenolol eine erneute Bindung von bereits abdissoziiertem $(-)^{-3}H$ -Dihydroalprenolol ablaufen, dann müßte durch die zusätzlich eingebrachten Membranen, die ja lauter unbesetzte Bindungsstellen haben, die erneute Bindung von $(-)^{-3}H$ -

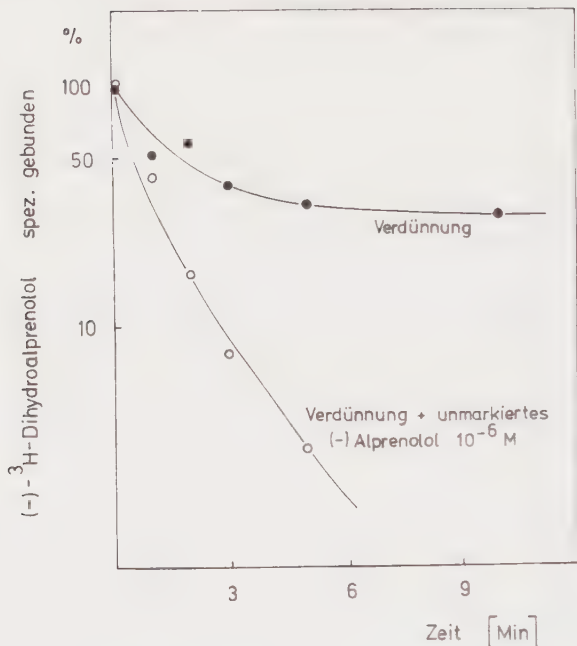


Abb. 19

Abdissoziation von (-)-³H-Dihydroalprenolol von Herzmuskelmembranen durch Verdünnung 1:100 in Abwesenheit und Gegenwart von 10⁻⁶ M (-)-Alprenolol

1,64 mg Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit $6,4 \times 10^{-9}$ M (-)-³H-Dihydroalprenolol bei einem Gesamtvolumen von 0,3 ml 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend pipettierten wir je 0,1 ml davon (= 0,5466 mg Protein) zu 9,9 ml Inkubationspuffer (7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl₂) und zu 9,9 ml Inkubationspuffer plus 10⁻⁶ M (-)-Alprenolol. Die Verdünnungsvolumina waren jeweils auf 37°C vorgewärmt. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt. Die prozentuale membrangebundene spezifische Radioaktivität wurde logarithmisch gegen die Zeit [min] aufgetragen. t = 0 = Zeitpunkt unmittelbar nach der Verdünnung 1:100; die zu diesem Zeitpunkt gemessene spezifisch gebundene Radioaktivität entspricht 100 %.

- — ● Verdünnung 1:100 in Abwesenheit von (-)-Alprenolol
- — ○ Verdünnung 1:100 in Gegenwart von 10⁻⁶ M (-)-Alprenolol

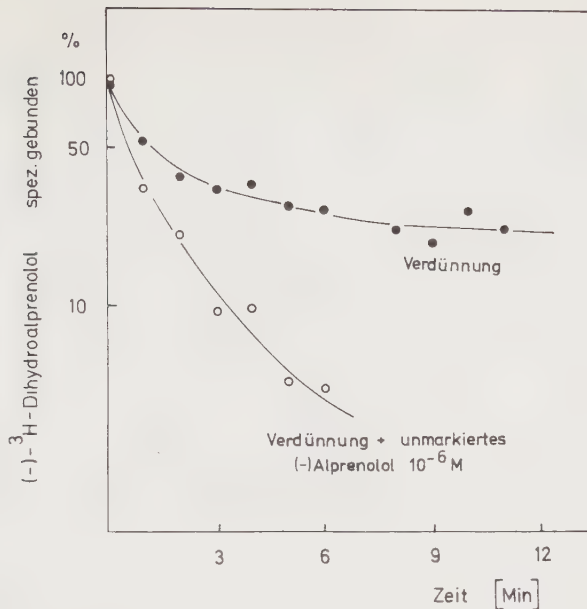


Abb. 20

Abdissoziation von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol von Lungengewebe durch Verdünnung 1:100 in Abwesenheit und Gegenwart von $10^{-6}\text{M } (-)\text{Alprenolol}$

1,6 mg Lungengewebe von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit $6,4 \times 10^{-9}\text{M } (-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol bei einem Gesamtvolumen von 0,3 ml 15 min bei 37°C inkubiert. Die weitere Versuchsdurchführung entspricht der Beschreibung von Abb. 19.

- — ● Verdünnung 1:100 in Abwesenheit von $(-)\text{Alprenolol}$
- — ○ Verdünnung 1:100 in Gegenwart von $10^{-6}\text{M } (-)\text{Alprenolol}$

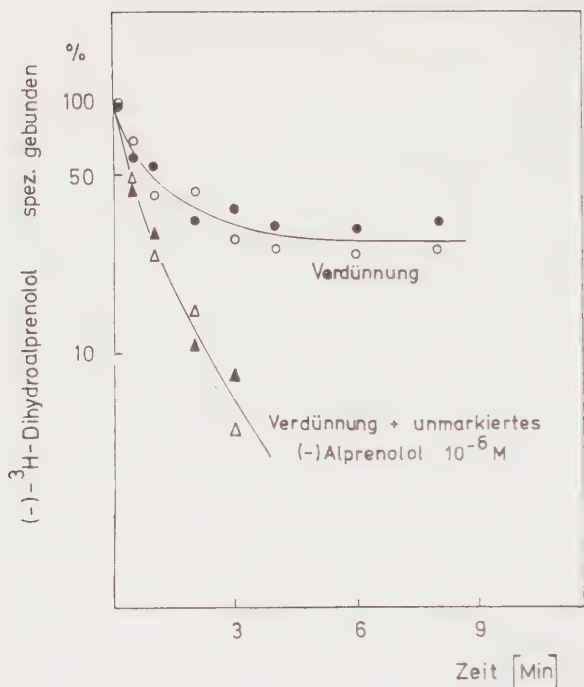


Abb. 21

Abdissoziation von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol von Herzmuskelmembranen durch Verdünnung 1:100 mit und ohne Zugabe von "frischen" Membranen

1,65 mg Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit $6,4 \times 10^{-9}\text{M}$ $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml 15 min bei 37°C inkubiert und dann geteilt. Die eine Hälfte wurde mit "frischen" Membranen zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt, die andere Hälfte wurde mit der gleichen Menge Inkubationspuffer (7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2) aufgestockt. Beide Versuchsansätze wurden dann rasch 1:100 verdünnt ($t = 0$) und die Reaktion zu den angegebenen Zeiten durch Vakuumfiltration gestoppt. Die Verdünnung wurde jeweils mit und ohne 10^{-6}M $(-)\text{Alprenolol}$ durchgeführt. Die prozentuale membrangebundene spezifische Radioaktivität wurde logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

Verdünnung 1:100 ohne $(-)\text{Alprenolol}$:

- Inkubationsansatz + zusätzliche "frische" Membranen
- Inkubationsansatz + Inkubationspuffer

Verdünnung 1:100 mit 10^{-6}M $(-)\text{Alprenolol}$:

- ▲—▲ Inkubationsansatz + zusätzliche "frische" Membranen
- △—△ Inkubationsansatz + Inkubationspuffer

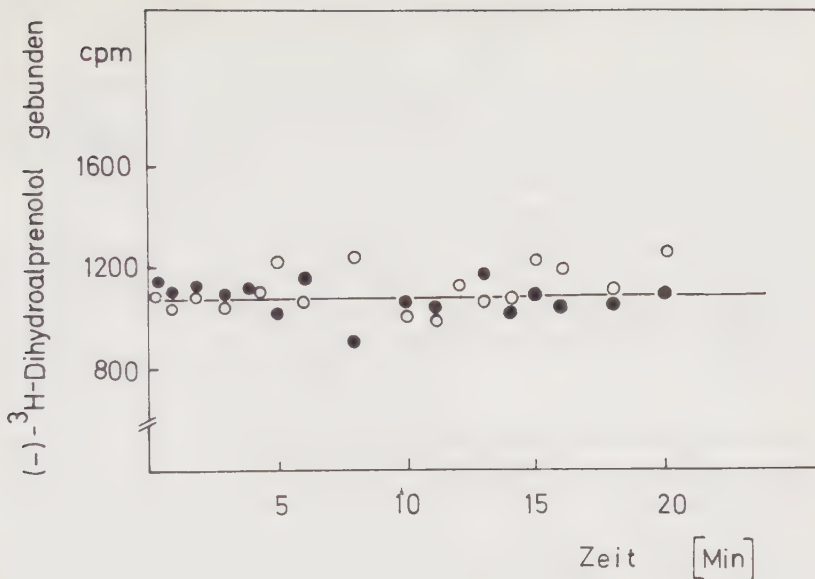


Abb. 22

Bindungsverhalten von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol nach Verdünnung 1:100 mit und ohne 10^{-6}M $(-)$ Alprenolol an hitzedenaturierten Membranen

1,6 mg einer hitzedenaturierten Herzmuskelmembransuspension von Meer-schweinchen wurden mit $6,4 \times 10^{-9}\text{M}$ $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol in einem Gesamt-volumen von 0,3 ml 15 min bei 37°C inkubiert. Davon wurde 0,1 ml (= 0,53 mg Protein) in ein Inkubationsröhrchen mit 9,9 ml auf 37°C vor-gewärmten Inkubationspuffer (7,5 mM Tris-HCl pH 7,45, 2,5 mM MgCl_2) pi-pettiert. Die Verdünnung 1:100 wurde mit und ohne 10^{-6}M $(-)$ Alprenolol durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten haben wir die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt.

● — ● Verdünnung 1:100 in Abwesenheit von $(-)$ Alprenolol

○ — ○ Verdünnung 1:100 in Gegenwart von 10^{-6}M 1-Alprenolol

Dihydroalprenolol an die Membransuspension durch eine höhere membrangebundene Radioaktivität nachweisbar sein.

Zum Beweis, daß die beschleunigte Dissoziation kein unspezifischer Membraneffekt ist und tatsächlich nur an spezifischen Bindungsstellen auftritt, haben wir hitzedenaturierte Membranen (vgl. 3.1.1) in der beschriebenen Weise mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol inkubiert und anschließend in Abwesenheit und Gegenwart von 10^{-6}M $(-)\text{Alprenolol}$ eine 1:100 Verdünnung durchgeführt (Abb. 22). Beide Versuchsansätze zeigen weder eine Dissoziation noch eine unterschiedliche Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an die Membranen.

3.4 Bindungsexperimente im Äquilibrium

3.4.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für beta-adrenerge Antagonisten und der Anzahl beta-adrenerger Rezeptoren durch Auftragung nach Scatchard (152)

Da die Betablocker $(-)\text{Alprenolol}$ als $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol und $(\pm)\text{Pindolol}$ als ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol auch radioaktiv markiert zur Verfügung stehen, kann durch konzentrationsabhängige Rezeptorbindungsexperimente, die im Äquilibrium durchgeführt werden müssen, die Dissoziationskonstante dieser Betablocker und die Gesamtzahl ihrer spezifischen Bindungsstellen gemessen werden, wenn die Ergebnisse nach der Methode von Scatchard (152) grafisch aufgetragen werden.

Zur Durchführung der Bindungsversuche wurden jeweils 1,6 Picomole $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol mit steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden $((-)\text{Alprenolol})$ sowie der Membransuspension 10 min bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml inkubiert. Die Konzentration von $(-)\text{Alprenolol}$ wurde dabei schrittweise bis zum unspezifischen Bereich erhöht. Die insgesamt eingesetzte Radioaktivität von 1,6 Picomolen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurde in counts per minute (cpm) gemessen

und ergab z.B. 73 000 cpm. Davon wurde mit 1600 cpm nur ein geringer Anteil gebunden, wobei die unspezifische Bindung 800 cpm und die spezifische Bindung ebenfalls 800 cpm betragen hat. Von den eingesetzten 1,6 Picomolen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden in diesem Experiment somit nur 0,017 Picomole spezifisch gebunden; die restlichen 1.583 Picomole $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol waren frei. Bei Zugabe von 10^{-8} M $(-)\text{Alprenolol}$ waren insgesamt 11,6 Picomole des beta-adrenergen Antagonisten in 1,0 ml Inkubationsvolumen vorhanden. Die gemessene membrangebundene Radioaktivität betrug aber hier nur 1000 cpm, da die Bindung von 1,6 Picomolen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch die Zugabe von 10 Picomolen $(-)\text{Alprenolol}$ gehemmt wurde. Nach Abzug der unspezifischen Bindung von 800 cpm entsprach die spezifische Bindung 200 cpm. Da jetzt bei gleicher insgesamt eingesetzter Radioaktivität (73 000 cpm) 11,6 Picomole des beta-adrenergen Blockers im Inkubationsvolumen eingesetzt waren, wurden nun 0,0318 Picomole $(-)\text{Alprenolol}$ spezifisch gebunden, und es waren 11,5682 Picomole noch frei. Die bei weiteren Konzentrationen des beta-adrenergen Antagonisten berechneten Anteile des rezeptorgebundenen und freien $(-)\text{Alprenolols}$ und deren Auftragung nach Scatchard (152) zeigen die Abbildungen 23 und 24 an Herzmuskelmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen. Nach der Analyse von Scatchard (152) wird der Quotient aus gebunden/frei um so kleiner, je mehr Picomole des beta-adrenergen Antagonisten eingesetzt werden; das bedeutet, daß der Anteil des freien $(-)\text{Alprenolols}$ stark steigen muß, damit wenig mehr $(-)\text{Alprenolol}$ spezifisch gebunden werden kann.

Analoge Bindungsexperimente an Herzmuskelmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen führten wir mit jeweils 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol durch, dessen Bindung an beta-adrenerge Rezeptoren durch steigende Konzentrationen von unmarkiertem $(\pm)\text{Pindolol}$ kompetitiv gehemmt wurde (Abb. 25, 26).

Bei allen unseren Bindungsversuchen, deren Ergebnisse wir nach der Analyse von Scatchard (152) aufgetragen haben, erhielten wir eine gekrümmte Kurve als Ausdruck mindestens zweier verschiedener Dissoziationskonstanten. Da wir bei den in

3.3.3 beschriebenen Dissoziationsversuchen, die bei verschiedenen hoher Rezeptorbesetzung durchgeführt wurden, eine schnellere Abdissoziation des $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolols vom Beta-rezeptor nachweisen konnten, wenn eine größere Anzahl von spezifischen Rezeptoren mit dem beta-adrenergen Antagonisten besetzt war, ist die nach oben konkave Kurve, die sich nach der Analyse von Scatchard (152) ergibt, am ehesten Ausdruck einer negativ kooperativen Wechselwirkung zwischen den beta-adrenergen Rezeptoren und nicht zweier oder mehr morphologisch unterschiedlicher Rezeptoren mit verschiedener Affinität zum gleichen Liganden.

Die anhand der Scatchard-Auftragung errechneten Dissoziationskonstanten (K_D) und Bindungskapazitäten für die Bindungsstellen mit der höchsten Affinität (R_1) und die Bindungsstellen mit der niedrigsten Affinität (R_2) sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Bestimmung von K_D und Bindungskapazität führten wir nach den Berechnungen von Weidemann et al. (175) durch; wir benutzten dazu ein Computerprogramm (Hewlett-Packard HP 9830), das die experimentellen Werte entsprechend der Gauß-Newton-Verteilung berücksichtigte.

	(-)ALPRENOLOL		(±)PINDOLOL	
	Herz	Lunge	Herz	Lunge
$R_1 : K_D \text{ (M)}$	6×10^{-9}	$3,3 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-9}$	$2,85 \times 10^{-9}$
Bindungskapazität (pMole/mg Protein)	0,18	0,13	0,34	1,4
$R_2 : K_D \text{ (M)}$	$4,3 \times 10^{-6}$	$8,3 \times 10^{-7}$	$8,27 \times 10^{-8}$	$3,6 \times 10^{-8}$
Bindungskapazität (pMole/mg Protein)	22,8	5,86	5,2	8,9

Tab. 3

Berechnung der Dissoziationskonstanten und Bindungskapazität anhand der Analyse nach Scatchard (152)

(s. Abb. 23-26)

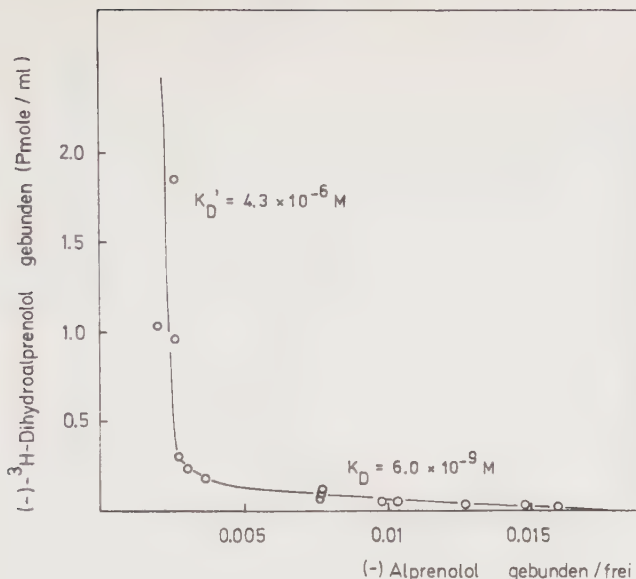


Abb. 23

Bindung von $(-)\text{-}^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Herzmuskelmembranen in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Ligan- den; Auftragung nach Scatchard (152)

0,5 mg Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen (modi- fizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 1,6 Picomolen $(-)\text{-}^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol und steigen- den Konzentrationen unmarkierten $(-)$ Alprenolols (10^{-9}M bis 10^{-5}M) 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch rasche Filtration gestoppt. Jeder Wert wurde 3fach be- stimmt und gemittelt.

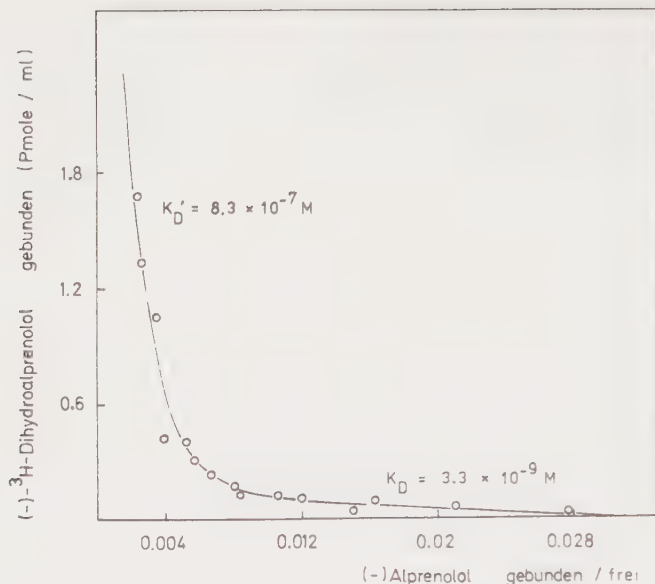


Abb. 24

Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol an Lungengewebe in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Liganden; Auftragung nach Scatchard (152)

0,54 mg Lungengewebe von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 1,6 Picomolen (-)-³H-Dihydroalprenolol und steigenden Konzentrationen unmarkierten (-)Alprenolols (10^{-9} M bis 10^{-5} M) 10 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch rasche Filtration gestoppt. Jeder Wert wurde 3fach bestimmt und gemittelt.

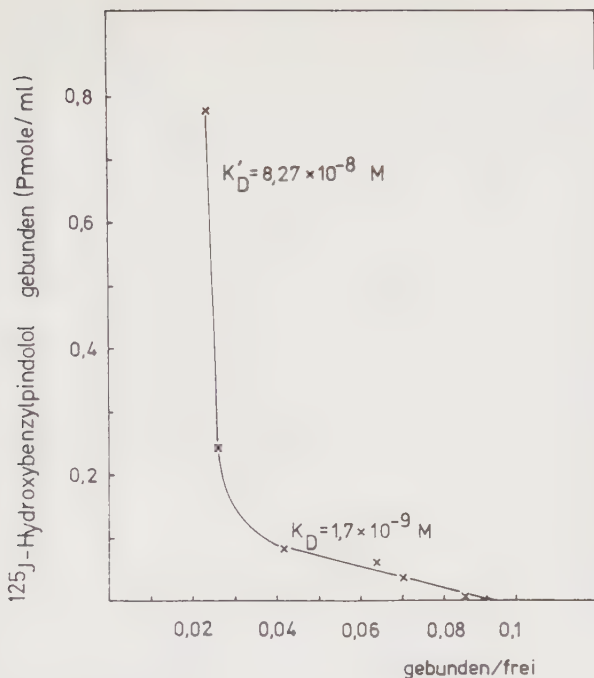


Abb. 25

Bindung von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Herzmuskelmembranen in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Liganden; Auftragung nach Scatchard (152)

0,45 mg Herzmuskelmembransuspension von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol und steigenden Konzentrationen unmarkierten ($\pm$)Pindolols (10^{-10} M bis 10^{-5} M) 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch rasche Filtration gestoppt. Jeder Wert wurde 3fach bestimmt und gemittelt.

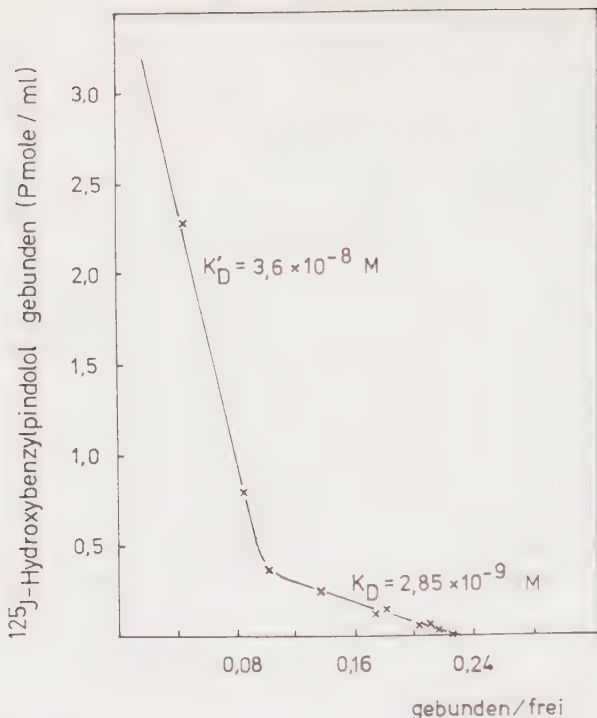


Abb. 26

Bindung von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Lungengewebe in Gegenwart steigender Konzentrationen des unmarkierten Liganden; Auftragung nach Scatchard (152)

0,45 mg Lungengewebe von Meerschweinchen (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) wurden mit 0,00875 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol und steigenden Konzentrationen unmarkierten ($\pm$)Pindolols (10^{-10} M bis 10^{-5} M) 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch rasche Filtration gestoppt. Jeder Wert wurde 3fach bestimmt und gemittelt.

3.4.2 Hemmung der Bindung eines markierten beta-adrenergen Antagonisten durch unmarkierte Agonisten und Antagonisten

Durch eine konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung eines markierten beta-adrenergen Antagonisten am Betarezeptor kann die Dissoziationskonstante beta-adrenerger Pharmaka, die nicht radioaktiv markiert zur Verfügung stehen, ermittelt werden. Bei den Bindungsexperimenten kann diejenige Konzentration des unmarkierten beta-adrenergen Liganden, die eingesetzt werden muß, um die Bindung des hochaffinen markierten Antagonisten um 50 % zu hemmen, direkt gemessen werden. Diese Konzentration (EC_{50}) kann nach der von Cheng und Prusoff (36) angegebenen Gleichung [1] in die Dissoziationskonstante K_D des unmarkierten beta-adrenergen Pharmakons umgerechnet werden:

$$K_D = \frac{EC_{50}}{\frac{[I]}{K_I} + 1} \quad [1]$$

$[I]$ = eingesetzte Konzentration des markierten Antagonisten

K_I = Dissoziationskonstante des markierten Antagonisten

Die eingesetzte Konzentration des markierten Antagonisten $[I]$ sollte hierbei niedriger sein als seine (bekannte) Dissoziationskonstante K_I . Da unter dieser Voraussetzung nur wenig Rezeptoren durch den radioaktiv markierten Antagonisten besetzt sind, erhält man ein empfindliches System, um die Abnahme der spezifisch gebundenen Radioaktivität in Gegenwart von unmarkierten beta-adrenergen Substanzen zu messen.

Zur Untersuchung eines selektiven Bindungsverhaltens haben wir die Dissoziationskonstanten verschiedener beta-adrenerger Agonisten und Antagonisten an Herzmuskelmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen experimentell ermittelt. Als radioaktiv markierte Liganden verwendeten wir $(-)^{-3}H$ -Dihydroalprenolol und ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol.

a) Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol

Die spezifische Bindung von jeweils 1,6 Picomolen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an die Membranproteine von Herz und Lunge wurde durch steigende Konzentrationen der in Abb. 27-32 bzw. in Tab. 5 A aufgeführten beta-adrenergen Agonisten kompetitiv gehemmt. Bei jedem Versuch wurde zur Überprüfung des Systems eine konzentrationsabhängige Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ Alprenolol durchgeführt. Ein Vergleich der dabei jedesmal nach Gleichung [1] ermittelten Dissoziationskonstanten mit dem nach der Auftragung nach Scatchard (152) gemessenen K_D -Wert von $(-)$ Alprenolol zeigte eine gute Übereinstimmung (Tab. 4). Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt; ein exemplarisches Versuchsergebnis wird jeweils abgebildet (Abb. 27-32, Tab. 5).

Keiner der getesteten Agonisten zeigt eine absolute Organspezifität. Protokylol und die Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly binden sich an das Lungengewebe von Meerschweinchen 10mal stärker als an die Herzmuskelfmembranen, wohingegen keiner der untersuchten Agonisten eine relative Kardioselektivität aufweist. Für l-Isoprenalin, d-Isoprenalin, l-Adrenalin, dl-Adrenalin, die Versuchssubstanz MJ 8798-1 der Fa. Mead Johnson, Fenoterol, Salbutamol, Terbutaline-Sulfat und Dopamin fanden wir keinen signifikanten Unterschied im Bindungsverhalten an Herzmuskelfmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen.

b) Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Antagonisten

Die spezifische Bindung von jeweils 1,6 Picomolen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Herzmuskelfmembranen und an Lungengewebe von Meerschweinchen wurde durch steigende Konzentrationen der in Abb. 33-35 aufgeführten beta-adrenergen Antagonisten kompetitiv gehemmt. Auch hier wurde bei jedem Versuch eine Eichkurve mit $(-)$ Alprenolol durchgeführt. Die gemessenen EC_{50} -Werte und die daraus berechneten Dissoziationskonstanten sind in Tab. 5 B aufgelistet. Für die Versuchssubstanz H35/25 der Fa.

Hassle konnten wir beim Organvergleich eine deutlich höhere Affinität zum Lungengewebe nachweisen. Umgekehrt verhalten sich Metoprolol und Atenolol, wobei insbesondere die zuletzt genannte Substanz eine höhere Affinität zu Herzmuskelmembranen zeigt (Abb. 34). Die übrigen getesteten Betablocker weisen an Herz und Lunge das gleiche Bindungsverhalten auf (Abb. 33, 35, Tab. 5 B).

c) Hemmung der Bindung von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol durch Antagonisten

^{125}J -Hydroxybenzylpindolol (2200 Ci/mMol) besitzt im Vergleich zu $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol (32,6 Ci/mMol) eine wesentlich höhere spezifische Radioaktivität. Bei gleicher Ausbeute der Radioaktivität, gemessen in cpm, kann man das ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol in einer um den Faktor 1000 niedrigeren Konzentration einsetzen (8,75 Femtomole pro ml Ansatz) und somit bei einer viel geringeren Rezeptorbesetzung messen als mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol, das für Bindungsstudien in einer Konzentration von 1,6 Picomolen pro ml Ansatz verwendet wurde. Daraus ergibt sich mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol eine höhere Empfindlichkeit des Assays. Die Affinität von $(\pm)$ Pindolol zum beta-adrenergen Rezeptor ist der von $(-)$ Alprenolol vergleichbar (vgl. Tab. 3). Die Nachteile von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol sind seine kurze Halbwertszeit von 60 Tagen (Tritium 12,26 Jahre) und die Bildung von Nebenprodukten, seine höhere Strahlungsenergie im Vergleich zum Tritium und die Tatsache, daß es nur als Racemat verfügbar ist (9, 10, 25, 26, 66, 120).

Die spezifische Bindung von jeweils 0,00878 Picomolen ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen wurde durch steigende Konzentrationen von $(-)$ Alprenolol sowie der relativ kardioselektiven Betablocker Atenolol und Metoprolol kompetitiv gehemmt (Abb. 36). Die Organselektivität dieser beiden Antagonisten mit einer höheren Affinität zu Herzmuskelmembranen ist hier deutlicher ausgeprägt als bei der Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol. $(-)$ Alprenolol zeigt bei den Bindungsstudien mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol und $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol dasselbe

Bindungsverhalten an Herz und Lunge von Meerschweinchen. Die mit verschiedenen Methoden ermittelten Dissoziationskonstanten für (-)Alprenolol an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen stimmen gut überein (Tab. 4). Dieses Ergebnis zeigt, daß sich die einzelnen beta-adrenergen Liganden wahrscheinlich an die gleichen Rezeptoren binden.

HERZ	A [M]	B [M]	C [M]
(-)Alprenolol	6×10^{-9}	$1,57 \times 10^{-9}$	$2,19 \times 10^{-9}$
(-)Propranolol	$1,6 \times 10^{-9}$	$3,5 \times 10^{-9}$	
(±)Pindolol	$1,7 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^{-9}$	

LUNGE	A [M]	B [M]	C [M]
(-)Alprenolol	$3,3 \times 10^{-9}$	$3,38 \times 10^{-9}$	$1,89 \times 10^{-9}$
(-)Propranolol	$1,76 \times 10^{-9}$	$2,7 \times 10^{-9}$	
(±)Pindolol	$2,85 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^{-9}$	

A: K_D ermittelt durch die Analyse nach Scatchard (152)

B: K_D ermittelt durch Hemmung der Bindung von (-)- 3H -Dihydroalprenolol

C: K_D ermittelt durch Hemmung der Bindung von ^{125}I -Hydroxybenzylpindolol

Tab. 4

K_D -Bestimmung durch zwei verschiedene Methoden an Herzmuskelmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen

A)	AGONIST	HERZ		LUNGE	
		EC ₅₀ [M]	K _D [M]	EC ₅₀ [M]	K _D [M]
	l-Isoprenalin	3,2 x 10 ⁻⁷	2,5 x 10 ⁻⁷	2 x 10 ⁻⁷	1,35 x 10 ⁻⁷
	d-Isoprenalin	6 x 10 ⁻⁶	4,7 x 10 ⁻⁶	4,8 x 10 ⁻⁶	3,2 x 10 ⁻⁶
	Protokylol	5 x 10 ⁻⁷	3,9 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁸	3,4 x 10 ⁻⁸
	l-Adrenalin	3,2 x 10 ⁻⁶	2,5 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶	6,76 x 10 ⁻⁷
	dl-Adrenalin	2,2 x 10 ⁻⁶	1,7 x 10 ⁻⁶	4,5 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁶
	Versuchssubstanz MJ 8798-1 der Fa. Mead Johnson	4 x 10 ⁻⁶	3,15 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶	6,76 x 10 ⁻⁷
	Noradrenalin	4 x 10 ⁻⁶	3,15 x 10 ⁻⁶	7 x 10 ⁻⁶	4,7 x 10 ⁻⁶
	Fenoterol	5 x 10 ⁻⁶	3,9 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶	1,35 x 10 ⁻⁶
	Salbutamol	1 x 10 ⁻⁵	7,9 x 10 ⁻⁶	3,2 x 10 ⁻⁶	2,1 x 10 ⁻⁶
	Terbutaline Sulfat	6 x 10 ⁻⁵	4,7 x 10 ⁻⁵	7 x 10 ⁻⁵	4,7 x 10 ⁻⁵
	Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly	3,2 x 10 ⁻⁵	2,5 x 10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻⁶	1,2 x 10 ⁻⁶
	Dopamin	3,2 x 10 ⁻⁴	2,5 x 10 ⁻⁴	2,5 x 10 ⁻⁴	1,7 x 10 ⁻⁴

B)	ANTAGONIST	HERZ		LUNGE	
		EC ₅₀ [M]	K _D [M]	EC ₅₀ [M]	K _D [M]
	(-)Alprenolol	2 x 10 ⁻⁹	1,57 x 10 ⁻⁹	5 x 10 ⁻⁹	3,38 x 10 ⁻⁹
	(+)Alprenolol	1,8 x 10 ⁻⁷	1,4 x 10 ⁻⁷	3,2 x 10 ⁻⁷	2,16 x 10 ⁻⁷
	(±)Pindolol	3 x 10 ⁻⁹	2,3 x 10 ⁻⁹	3,5 x 10 ⁻⁹	2,3 x 10 ⁻⁹
	(-)Propranolol	5 x 10 ⁻⁹	3,5 x 10 ⁻⁹	4 x 10 ⁻⁹	2,7 x 10 ⁻⁹
	(+)Propranolol	2,5 x 10 ⁻⁷	1,79 x 10 ⁻⁷	1,5 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁷
	(-)Bupranolol	8 x 10 ⁻⁹	6,3 x 10 ⁻⁹	6 x 10 ⁻⁹	4 x 10 ⁻⁹
	(±)Bupranolol	5,5 x 10 ⁻⁸	4,3 x 10 ⁻⁸	7 x 10 ⁻⁸	4,7 x 10 ⁻⁸
	Timolol	1 x 10 ⁻⁸	7,9 x 10 ⁻⁹	1,8 x 10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁻⁸
	Atenolol	5 x 10 ⁻⁷	3,9 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁵	6,76 x 10 ⁻⁶
	Metoprolol	2 x 10 ⁻⁶	1,57 x 10 ⁻⁶	8 x 10 ⁻⁶	5,4 x 10 ⁻⁶
	(+)Inpea	3,2 x 10 ⁻⁶	2,5 x 10 ⁻⁶	1,8 x 10 ⁻⁶	1,2 x 10 ⁻⁶
	(±)Inpea	2,5 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶	4,5 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁶
	Versuchssubstanz H 35/25 der Fa. Hassle	8 x 10 ⁻⁶	6,3 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶	6,76 x 10 ⁻⁷
	Isoxsuprim	1 x 10 ⁻⁵	7,87 x 10 ⁻⁶	2,6 x 10 ⁻⁶	1,7 x 10 ⁻⁶

Tab. 5 A und B

Durch Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol ermittelte EC₅₀ von Agonisten bzw. Antagonisten und deren K_D, berechnet nach der Formel von Cheng und Prusoff (36)

C)

ANTAGONIST	M.P.		LUNGE	
	EC ₅₀ [M]	K _D [M]	EC ₅₀ [M]	K _D [M]
(-)-Alprenolol	2,2 x 10 ⁻⁹	2,19 x 10 ⁻⁹	1,9 x 10 ⁻⁹	1,89 x 10 ⁻⁹
Metoprolol	6,4 x 10 ⁻⁷	6,36 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁷	4,98 x 10 ⁻⁵
Atenolol	7 x 10 ⁻⁷	6,96 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁷	4,98 x 10 ⁻⁵

Tab. 5 C

Durch Hemmung der Bindung von ¹²⁵J-Hydroxybenzylpindolol ermittelte EC₅₀ von Antagonisten und deren K_D, berechnet nach der Formel von Cheng und Prusoff (36)

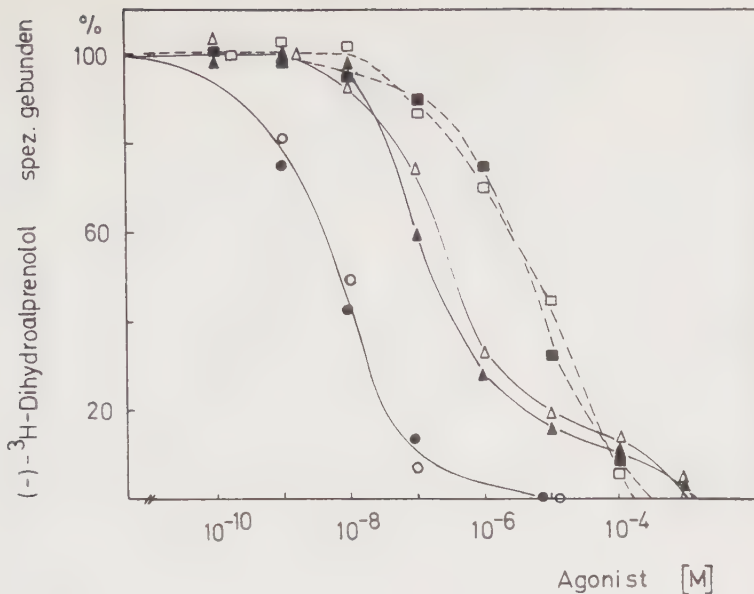


Abb. 27

Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10⁻¹⁰ M bis 10⁻³ M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an (-)-³H-Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

- l-Isoprenalin Δ—Δ Herzmuskelmembranen
- ▲—▲ Lungengewebe
- d-Isoprenalin □--□ Herzmuskelmembranen
- Lungengewebe
- (-)-Alprenolol o—o Herzmuskelmembranen
- Lungengewebe

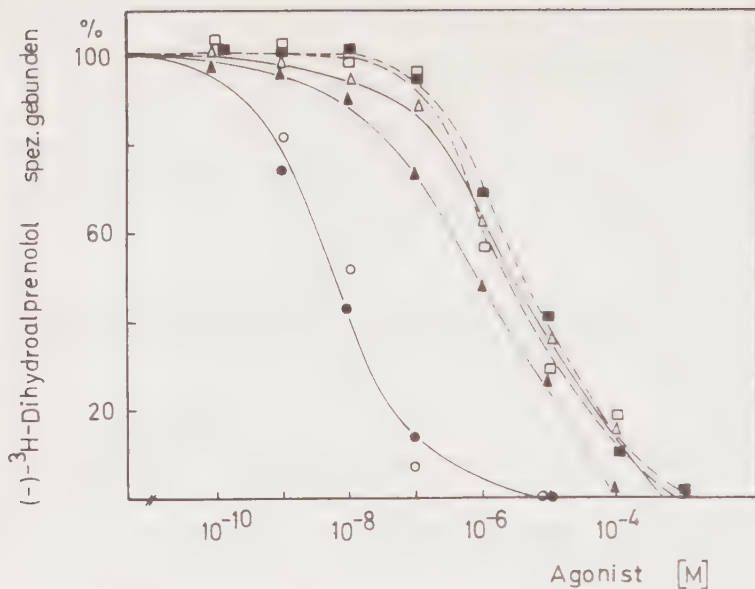


Abb. 28

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3–0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-3}M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

- 1-Adrenalin $\triangle-\triangle$ Herzmuskelmembranen
 $\blacktriangle-\blacktriangle$ Lungengewebe
- dl-Adrenalin $\square---\square$ Herzmuskelmembranen
 $\blacksquare---\blacksquare$ Lungengewebe
- $(-)$ Alprenolol $\circ-\circ$ Herzmuskelmembranen
 $\bullet-\bullet$ Lungengewebe

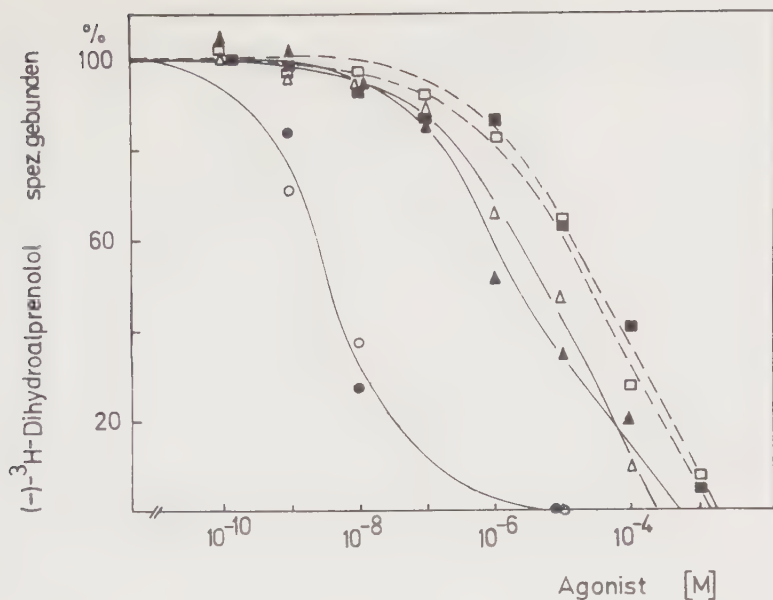


Abb. 29

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3–0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Fenoterol	$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
Terbutaline-Sulfat	$\square$ - - - $\square$	Herzmuskelmembranen
	$\blacksquare$ - - - $\blacksquare$	Lungengewebe
$(-)$ Alprenolol	$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

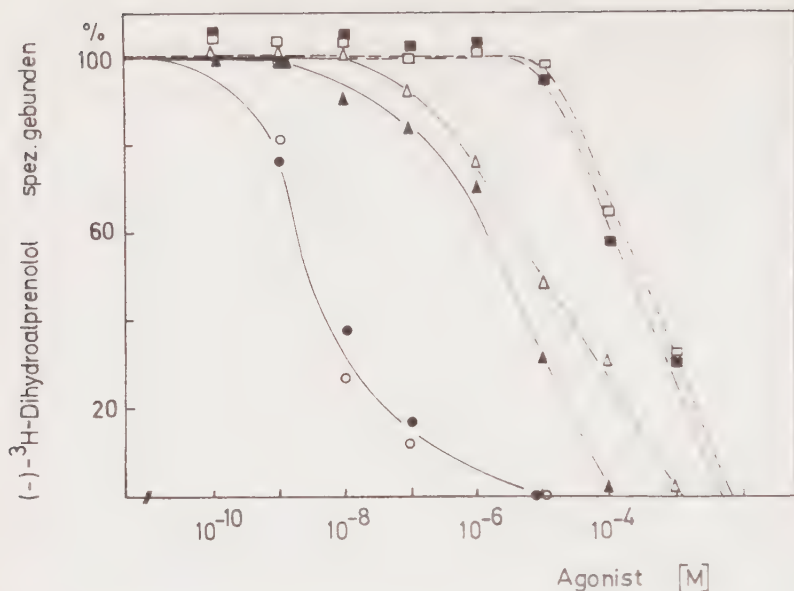


Abb. 30

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson 50) und steigenden Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-3}M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Salbutamol	$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
Dopamin	$\square$ --- $\square$	Herzmuskelmembranen
	$\blacksquare$ --- $\blacksquare$	Lungengewebe
$(-)$ Alprenolol	$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

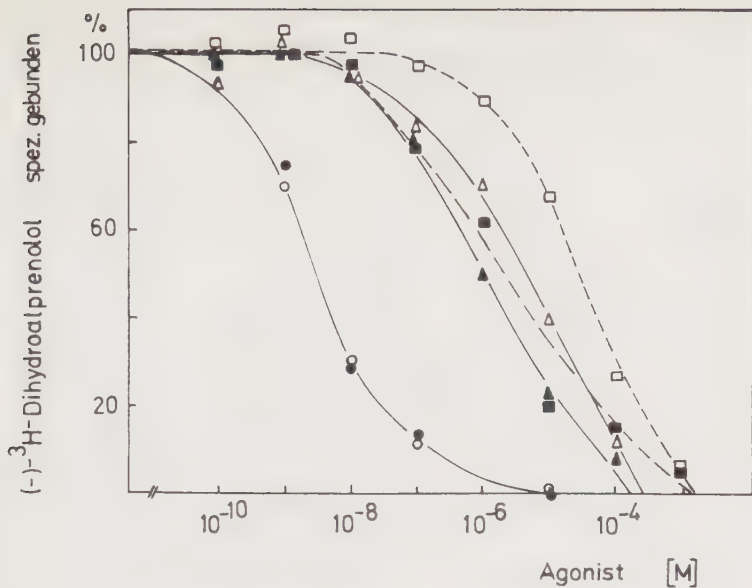


Abb. 31

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Versuchssubstanz MJ 8793-1	$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
der Fa. Mead Johnson	$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
Versuchssubstanz 46 868	$\square$ - - - $\square$	Herzmuskelmembranen
der Fa. Lilly	$\blacksquare$ - - - $\blacksquare$	Lungengewebe
$(-)$ Alprenolol	$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

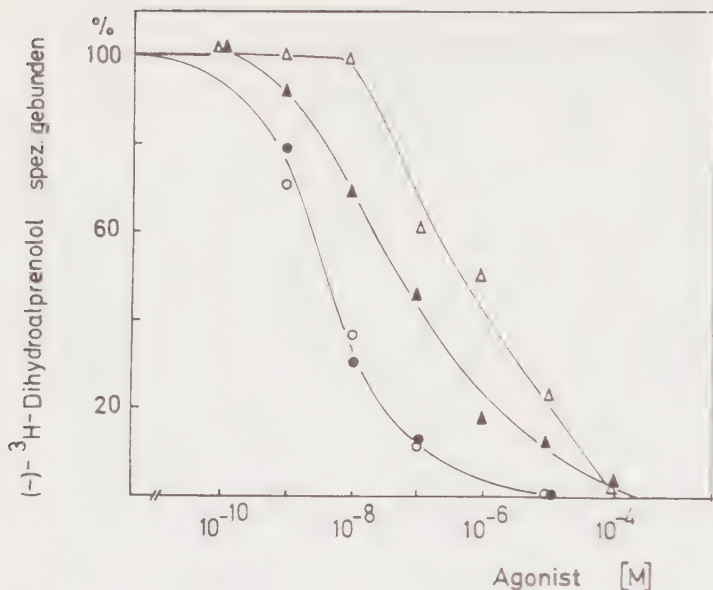


Abb. 32

Hemmung der Bindung von (-)-³H-Dihydroalprenolol durch Agonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole (-)-³H-Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10⁻¹⁰ M bis 10⁻³ M) der genannten unmarkierten Agonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an (-)-³H-Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Protokylol Δ — Δ Herzmuskelmembranen
 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ Lungengewebe
 (-)Alprenolol o—o Herzmuskelmembranen
 $\bullet$ — $\bullet$ Lungengewebe

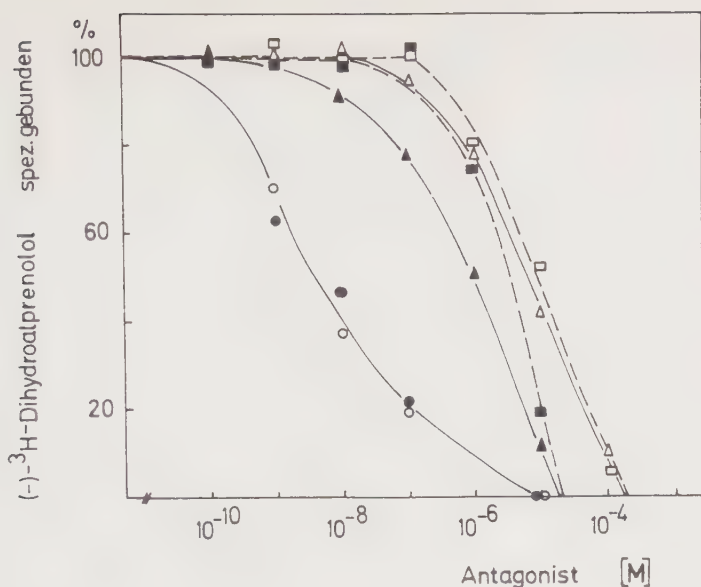


Abb. 33

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Antagonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Versuchssubstanz H 35/25
der Fa. Hassle

Isosuprim

$(-)$ Alprenolol

$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
$\square$ - - - $\square$	Herzmuskelmembranen
$\blacksquare$ - - - $\blacksquare$	Lungengewebe
$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

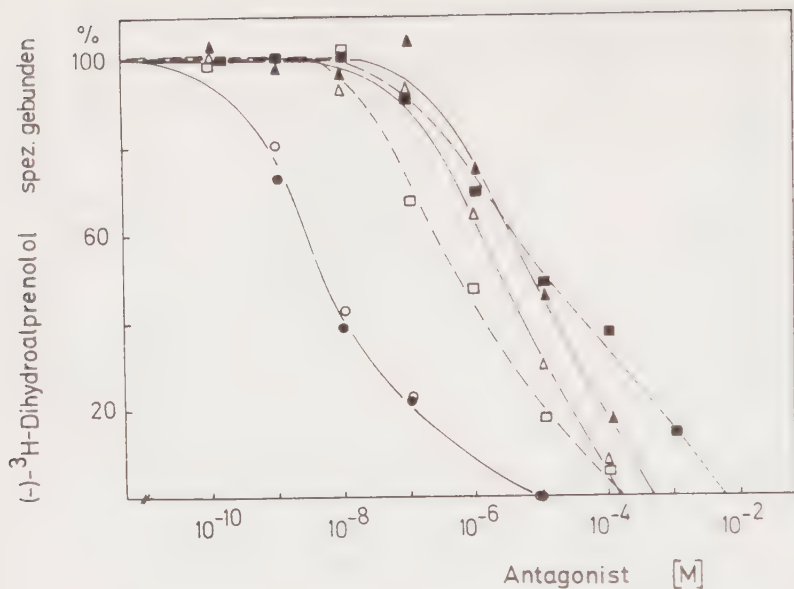


Abb. 34

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Antagonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Metoprolol	$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
Atenolol	$\square$ --- $\square$	Herzmuskelmembranen
	$\blacksquare$ --- $\blacksquare$	Lungengewebe
$(-)$ Alprenolol	$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

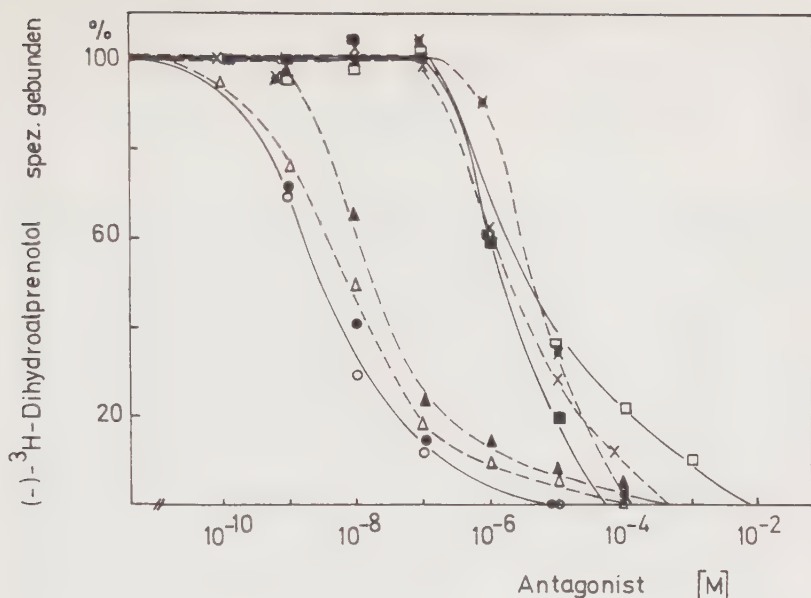


Abb. 35

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch Antagonisten an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol wurden mit 0,3–0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10} M bis 10^{-3} M) der genannten unmarkierten Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 10 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist in Prozent angegeben.

Timolol	$\triangle$ ----- $\triangle$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktriangle$ ----- $\blacktriangle$	Lungengewebe
$(-)\text{Inepa}$	$\square$ ----- $\square$	Herzmuskelmembranen
	$\blacksquare$ ----- $\blacksquare$	Lungengewebe
$(\pm)\text{Inepa}$	$\times$ ----- $\times$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktimes$ ----- $\blacktimes$	Lungengewebe
$(-)\text{Alprenolol}$	$\circ$ ----- $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ ----- $\bullet$	Lungengewebe

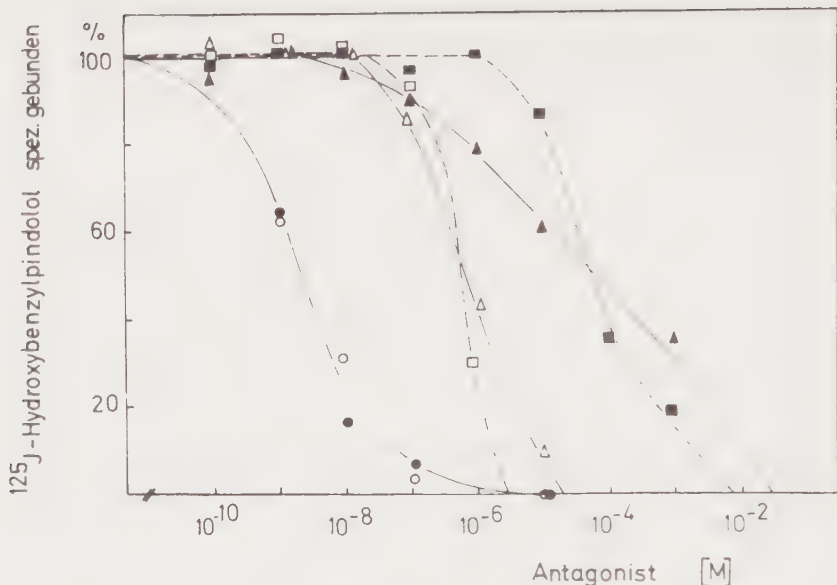


Abb. 36

Hemmung der Bindung von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol durch relativ kardio-selektive Antagonisten und (-)Alprenolol an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

0,00875 Picomole ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol wurden mit 0,3-0,45 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)) und steigenden Konzentrationen (10^{-10}M bis 10^{-3}M) der genannten unmarkierten Antagonisten in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 30 min bei 37°C inkubiert. Der spezifisch gebundene Anteil an ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol ist in Prozent angegeben.

Metoprolol	$\triangle$ — $\triangle$	Herzmuskelmembranen
	$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$	Lungengewebe
Atenolol	$\square$ ---- $\square$	Herzmuskelmembranen
	$\blacksquare$ ---- $\blacksquare$	Lungengewebe
(-)Alprenolol	$\circ$ — $\circ$	Herzmuskelmembranen
	$\bullet$ — $\bullet$	Lungengewebe

3.5 Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Adenylatzyklaseaktivität

3.5.1 Stereospezifische Hemmung der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklaseaktivität durch Antagonisten

Bei unseren Bindungsstudien haben wir spezifische beta-adrenerge Rezeptoren durch ihr stereospezifisches Bindungsverhalten nachgewiesen. Wenn wir dadurch tatsächlich den biologisch relevanten Betarezeptor charakterisiert haben und die nachgewiesenen Betarezeptoren mit der Adenylatzyklase gekoppelt sind, dann muß die durch beta-adrenerge Agonisten stimulierte Adenylatzyklase durch beta-adrenerge Antagonisten stereospezifisch hemmbar sein. Wir konnten nach dem in 2.5 beschriebenen Verfahren sowohl an Herzmuskelfembranen (Abb. 37) als auch am Lungengewebe (Abb. 38) von Meerschweinchen zeigen, daß die durch 1-Isoprenalin stimulierte Adenylatzyklase durch (-)Alprenolol und (+)Alprenolol im Konzentrationsbereich von 10^{-8} M bis 10^{-3} M stereospezifisch gehemmt wird. Die Abweichung der Konzentrationsbereiche, in denen sich Alprenolol stereospezifisch bindet und die Enzymaktivität stereospezifisch hemmt, wird verständlich durch die Anwesenheit von Agonisten und Nukleotiden bei der Messung der Enzymaktivität. Es ist bekannt, daß diese Substanzen die Dosis-Antwort-Kurve der Adenylatzyklase nach rechts in einen höheren Konzentrationsbereich verschieben (69, 121). Da in Abwesenheit von Nukleotiden durch Isoprenalin nur eine geringe Stimulation der Adenylatzyklase erreichbar war, haben wir die Versuche in Gegenwart von 7×10^{-6} M Gpp(NH)p durchgeführt. Isoprenalin wurde mit $12,7 \times 10^{-6}$ M eingesetzt, einer Konzentration, die das Enzym unter den jeweiligen Bedingungen maximal stimuliert. Die Inhibitionskonstante K_I , mit der diejenige Konzentration des Antagonisten bezeichnet wird, die nötig ist, um die durch Isoprenalin maximal stimulierte Adenylatzyklase um 50 % zu hemmen, haben wir nach der von Maguire et al. (120, 121) beschriebenen Gleichung berechnet:

$$K_I = \frac{I_{50} \times K_{act}}{A + K_{act}}$$

- I_{50} = Konzentration des Antagonisten, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind
 A = eingesetzte Konzentration des Agonisten
 K_{act} = Konzentration des Agonisten, bei der die Adenylatzyklase halbmaximal stimuliert wird

Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten K_D und der Inhibitionskonstanten K_I ergab eine gute Übereinstimmung zwischen Bindungsaffinität von Alprenolol am Rezeptor und der Hemmung der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklase durch diesen Antagonisten (Tab. 6). Zur Messung der Adenylatzyklaseaktivität und zur Durchführung der Bindungsstudien haben wir jeweils die nach Drummond und Severson (50) modifizierte Membranpräparation (ohne Anreicherung durch Lithiumbromid) benutzt. Diese Ergebnisse zeigen, daß wir an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen den biologisch relevanten Rezeptor charakterisiert haben und daß zwischen der Bindung des Antagonisten an den Rezeptor und der Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität ein konstantes Verhältnis besteht.

Gewebe	beta-adrenerger Antagonist	K_D nM	K_I nM
Herz	(-)Alprenolol	1,57	1,1
	(+)Alprenolol	14	200
Lunge	(-)Alprenolol	1,18	4,0
	(+)Alprenolol	216	300

Tab. 6

Vergleich von K_D und K_I an Herzmuskelmembranen und Lungengewebe von Meerschweinchen

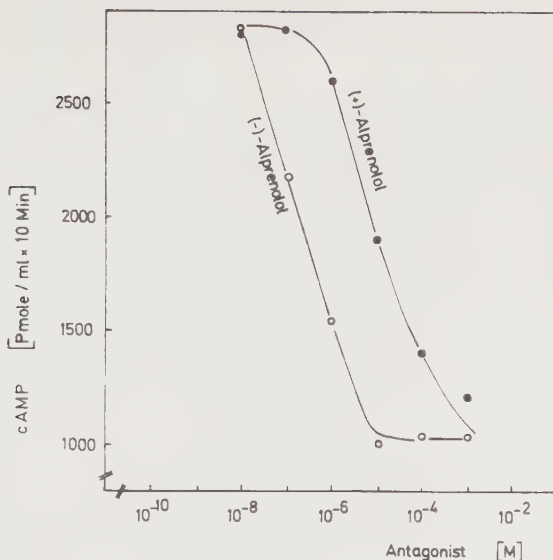


Abb. 37

Hemmung der Isoprenalin/Gpp(NH)p-stimulierten Adenylatzyklase durch Alprenolol an Herzmuskelmembranen von Meerschweinchen

Wir setzten $12,7 \times 10^{-6}$ M l-Isoprenalin, 7×10^{-6} M Gpp(NH)p sowie (-)- und (+)Alprenolol in den angegebenen Konzentrationen in den Adenylatzyklaseassay ein und führten den Versuch wie in 2.5 beschrieben durch. Die Werte von zwei in Doppelbestimmungen gemachten Experimenten wurden gemittelt.

Basale Aktivität der Adenylatzyklase : 594 pMole/mg Protein x 10 min

Maximal stimulierte Aktivität : 3540 pMole/mg Protein x 10 min

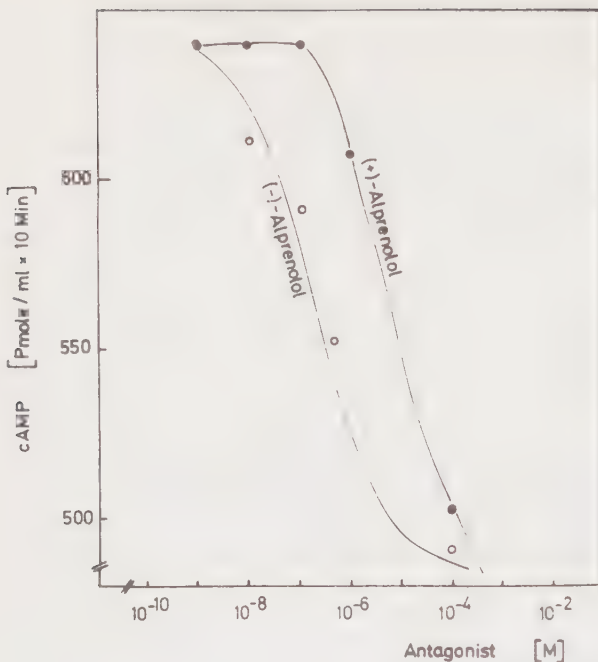


Abb. 38

Hemmung der Isoprenalin/Gpp(NH)p-stimulierten Adenylatzyklase durch Alprenolol am Lungengewebe von Meerschweinchen

Wir setzten $12,7 \times 10^{-6}$ M 1-Isoprenalin, 7×10^{-6} M Gpp(NH)p sowie (-)- und (+)Alprenolol in den angegebenen Konzentrationen in den Adenylatzyklaseassay ein und führten den Versuch wie in 2.5 beschrieben durch. Die Werte von zwei in Doppelbestimmungen gemachten Experimenten wurden gemittelt.

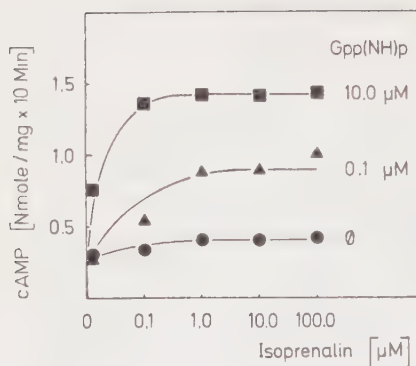
Basale Aktivität der Adenylatzyklase : 145 pMole/mg Protein x 10 min

Maximal stimulierte Aktivität : 635 pMole/mg Protein x 10 min

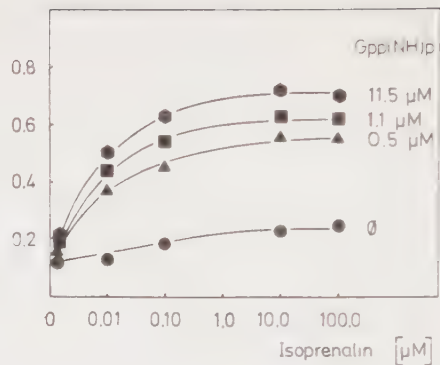
3.5.2 Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität der Adenylatzyklase und auf die Bindung beta-adrenerger Substanzen an den Rezeptor

l-Isoprenalin bindet in Abwesenheit von Nukleotiden mit einer K_D von $2,5 \times 10^{-7} M$ an Herzmuskelmembranen und mit einer K_D von $1,35 \times 10^{-7} M$ an Lungengewebe von Meerschweinchen (Tab. 5 A). Wir haben nun an den Membransuspensionen ebenfalls in Abwesenheit von Nukleotiden bei steigenden l-Isoprenalinkonzentrationen ($5 \times 10^{-8} M$ bis $10^{-4} M$) die Aktivität der Adenylatzyklase gemessen (Abb. 39 A und B). Bei diesen Versuchen konnten wir die Adenylatzyklase durch Einsetzen von Isoprenalin im K_D -Bereich kaum stimulieren. Allein die Rezeptorbesetzung mit einem Agonisten reicht auch hier nicht aus, um eine Enzymaktivierung zu erhalten. Fügen wir dagegen dem Inkubationsvolumen eine geringe Konzentration Gpp(NH)p zu ($0,1 \mu M$ bzw. $0,5 \mu M$), dann erhalten wir sowohl an Herzmuskelmembranen als auch am Lungengewebe eine deutliche Steigerung der Adenylatzyklaseaktivität mit einer K_{act} von $3,5 \times 10^{-8} M$. Führen wir den Adenylatzyklaseassay mit $11,5 \mu M$ Gpp(NH)p im Inkubationsvolumen durch, dann wird die Aktivität der Adenylatzyklase maximal gesteigert; höhere Konzentrationen, z.B. $100 \mu M$ Gpp(NH)p führen zu keiner weiteren Stimulation.

Im Gegensatz dazu wurde bei Bindungsversuchen die Affinität des beta-adrenergen Rezeptors zu l-Isoprenalin in Gegenwart von Gpp(NH)p ($100 \mu M$) deutlich erniedrigt; die K_D betrug jetzt $3,2 \times 10^{-6} M$ an Herzmuskelmembranen (Abb. 40) und $10^{-6} M$ am Lungengewebe (Abb. 41). Die Dissoziationskonstante (K_D) von Antagonisten änderte sich in Gegenwart von $100 \mu M$ Gpp(NH)p nicht.



A



B

Abb. 39

Isoprenalin-stimulierte Adenylatzyklaseaktivität in Abhängigkeit von Gpp(NH)p

A: Herzmuskelmembranen

B: Lungengewebe von Meerschweinchen

Die Aktivität der Adenylatzyklase wurde bei steigendem Isoprenalin und den angegebenen Gpp(NH)p-Konzentrationen nach der in 2.5 beschriebenen Methode gemessen. Weitere Ausführungen im Text.

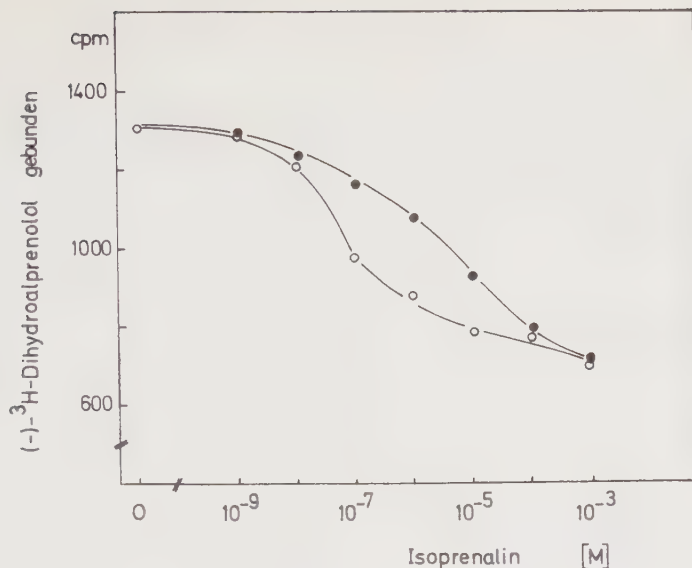


Abb. 40

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch l-Isoprenalin an Herzmuskelmembranen von Meerschweinchen in Abwesenheit und in Gegenwart von Gpp(NH)p

0,58 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)), 1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM MgCl₂ wurden mit den angegebenen Isoprenalinkonzentrationen einmal mit und einmal ohne Gpp(NH)p 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch rasche Filtration unterbrochen. Die gemessene membran-gebundene Radioaktivität ist in cpm angegeben. Jeder Wert wurde 3fach bestimmt und gemittelt.

K_D in Gegenwart von 100 µM Gpp(NH)p: $3,2 \times 10^{-6} \text{ M}$

K_D ohne Gpp(NH)p: $6,5 \times 10^{-8} \text{ M}$

● — ● 100 µM Gpp(NH)p im Inkubationsvolumen

○ — ○ kein Gpp(NH)p im Inkubationsvolumen

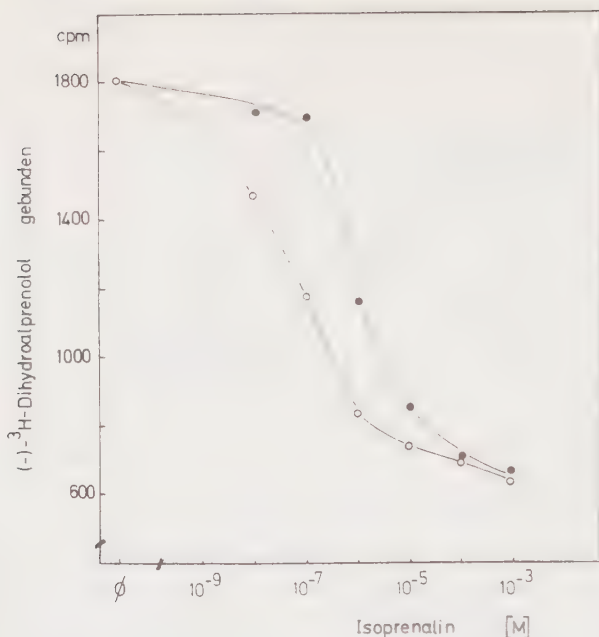


Abb. 41

Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch 1-Isoprenalin am Lungengewebe von Meerschweinchen in Abwesenheit und in Gegenwart von Gpp(NH)p

0,3 mg Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson (50)), 1,6 Picomole $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol, 5 mM Tris-HCl pH 7,45 und 2,5 mM MgCl_2 wurden mit den angegebenen Isoprenalkonzentrationen einmal mit und einmal ohne Gpp(NH)p 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch rasche Filtration unterbrochen. Die gemessene membrangebundene Radioaktivität ist in cpm angegeben. Jeder Wert wurde 3fach bestimmt und gemittelt.

K_D in Gegenwart von 100 μM Gpp(NH)p: $1 \times 10^{-6}\text{M}$

K_D ohne Gpp(NH)p: $6,5 \times 10^{-6}\text{M}$

● — ● 100 μM Gpp(NH)p im Inkubationsvolumen

○ — ○ kein Gpp(NH)p im Inkubationsvolumen

4. DISKUSSION

Das Konzept der beta-adrenergen Rezeptoren wurde durch klassische pharmakologische Untersuchungen (90) entwickelt, wobei physiologische Effekte wie z.B. Vasodilatation sowie positiv inotrope und chronotrope Wirkungen am Herzen gemessen wurden. Der biochemische Nachweis beta-adrenerger Rezeptoren gelang durch die Entwicklung hochaffiner radioaktiv markierter beta-adrenerger Pharmaka. Aurbach et al. (9) zeigten erstmals mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Membranen von Truthahnerythrozyten eine stereospezifische Bindung; Lefkowitz et al. (98) konnten an Membranen von Froscherythrozyten die Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol stereospezifisch hemmen. Für unsere Versuche zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer, d.h. biologisch relevanter Beta-rezeptoren an Herzmuskel- und Lungengewebsmembranen von Meerschweinchen haben wir ebenfalls die radioaktiv markierten betablockierenden Substanzen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol und ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol verwendet.

Die Messung der Anzahl und Affinität beta-adrenerger Rezeptoren wird dadurch erschwert und zum Teil verfälscht, daß sich die derzeit verfügbaren radioaktiv markierten betablockierenden Pharmaka nicht nur an ihren spezifischen Rezeptor, sondern auch an unspezifische Strukturen binden. Eine möglichst genaue Abgrenzung der spezifischen von der unspezifischen Bindung ist daher nötig. Unspezifische Bindungsstellen ließen sich durch Bindungsversuche in Abwesenheit von Membransuspension unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nachweisen. Es erfolgte eine rasche und reversible Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an das Glasfaserfilter (Tab. 1, Abb. 6), und unter gewissen Bedingungen konnte die Bindung des radioaktiv markierten Antagonisten bereits mit einer niedrigen Konzentration von Alprenolol (10^{-9}M) gehemmt werden (Abb. 5, obere Kurve); eine Stereospezifität hingegen konnte an diesen unspezifischen Bindungsstellen des Glasfaserfilters GF/C nicht gezeigt werden.

In ähnlicher Weise konnten Cuatrecasas und Hollenberg (44) die Bindung von ^{125}J -Glucagon an Celluloseacetat Millipore Filter in Abwesenheit von Membransuspension durch steigende Konzentrationen von Glucagon (10^{-8} M bis 10^{-4} M) und Wachstumshormon (10^{-7} M bis 10^{-3} M) hemmen; andere Hormone wie FSH, LH, Prolactin, Sekretin, Oxytocin, ACTH, TSH und Insulin zeigten auch in hoher Konzentration keine Hemmung der Bindung von ^{125}J -Glucagon. Cuatrecasas und Hollenberg (42) konnten außerdem die Bindung von ^{125}J -Insulin an Talcum durch Insulin und Proinsulin konzentrationsabhängig hemmen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte eine stereospezifische Bindung an unspezifische Strukturen wie Cerebrosidsulfat z.B. mit Opiaten (114) nachgewiesen werden; ebenso ist eine stereospezifische Bindung von ^3H -Naloxan an Glasfaserfilter (159) möglich. An der nach Drummond und Severson (50) modifizierten Membranpräparation (ohne Anreicherung durch Lithiumbromid) von Meerschweinchenherzen (Abb. 7, 32) und Meerschweinchenlungen (Abb. 11, 32) konnten wirhingegen die Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol stereospezifisch hemmen; dies gilt sowohl für Antagonisten (z.B. für Alprenolol in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-5} M (Abb. 7, 11)) als auch für Agonisten (Abb. 32). Ebenso konnten wir die übrigen zum Nachweis einer spezifischen beta-adrenergen Rezeptorbindung geforderten Kriterien, wie Assoziationsgeschwindigkeit, Reversibilität und hohe Affinität der Bindung sowie Sättigung der Bindungsstellen (35, 69, 94, 121), an der genannten Membranpräparation zeigen; allerdings haben wir diese Eigenschaften weitgehend (bis auf die Stereospezifität) auch an unspezifischen Strukturen nachgewiesen.

Die Abbildungen 7 und 11 zeigen, daß bei Zugabe von $(-)$ - oder $(+)$ Alprenolol $\geq 10^{-5}\text{ M}$ die Hemmung der Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Herzmuskel- bzw. Lungengewebsmembranen nicht mehr stereospezifisch ist. Die unter vergleichbaren Versuchsbedingungen durchgeführten Bindungsexperimente sowohl an Glasfaserfilter GF/C in Abwesenheit von nativer Membransuspension zur Darstellung unspezifischer Bindungsstellen (Abb. 5, untere Kurve) als auch an hitzedenaturierten Membranen (83,

Abb. 9) zeigen ebenfalls erst ab einer Konzentration von $\geq 10^{-5} \text{ M}$ Alprenolol eine nicht stereospezifische Hemmung der Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol. Der in Gegenwart von 10^{-5} M Alprenolol an einer nativen Membransuspension noch meßbare Anteil von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol ist genauso hoch wie die gesamte Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol an durch Hitze denaturierten Membranen. Die Bindung des markierten Antagonisten in Gegenwart von 10^{-5} M Alprenolol blieb während des ganzen Denaturierungsprozesses konstant (83, Abb. 7, 8). Offensichtlich werden während der langen Inkubation bei 37°C spezifische beta-adrenerge Rezeptoren zerstört, wobei die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen abnimmt, die Affinität der jeweils verbleibenden Betarezeptoren aber unverändert ist, wie die Auftragung des konzentrationsabhängigen Bindungsverlaufs nach Scatchard (152) zeigt, der mit einer Membran durchgeführt wurde, die 8 h bei 37°C inkubiert worden ist (Abb. 10). Während des Denaturierungsprozesses nimmt außerdem die Aktivität der durch Isoprenalin stimulierten Adenylatzyklase ab (83), wobei bereits nach 4-5 h keine Enzymaktivität mehr nachweisbar ist. Die Diskrepanz der Abnahme von spezifischen Rezeptoren und der durch Isoprenalin stimulierten Adenylatzyklase entspricht den Befunden von Orly und Schramm (133), daß es sich um zwei verschiedene Proteinmoleküle handelt.

Durch die beschriebenen Versuche erscheint es gerechtfertigt, spezifische beta-adrenerge Rezeptoren durch ihr stereospezifisches Bindungsverhalten zu identifizieren. Da wir außerdem an den gleichen Membransuspensionen die Aktivität der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklase durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} M bis 10^{-3} M stereospezifisch hemmen konnten (Abb. 37, 38), sehen wir es als erwiesen an, daß wir in unseren Versuchen den biologisch relevanten beta-adrenergen Rezeptor experimentell nachgewiesen haben. Die Diskrepanz der Konzentrationsbereiche, in denen Alprenolol sich stereospezifisch an den beta-adrenergen Rezeptor bindet (10^{-10} M bis 10^{-5} M) und die Adenylatzyklaseaktivität stereospezifisch hemmt (10^{-8} M bis 10^{-3} M), ist verständlich durch die Anwesenheit von 1-Isoprenalin (10^{-6} M) und $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$ (10^{-5} M) bei der Messung der Adenylatzyklaseaktivität. Es ist

bekannt, daß diese Substanzen die Dosis-Antwort-Kurve der Adenylatzyklase in einen höheren Konzentrationsbereich verschieben (69, 121). Eine stereospezifische Hemmung der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklaseaktivität durch beta-blockierende Pharmaka ist außer an Membranen von Meerschweinchenherzen (84) an einer Reihe anderer Gewebe beschrieben worden, z.B. an Membranen von Truthahnerythrozyten (9, 10, 26), an Membranen von Froscherythrozyten (98, 130), an Glioma-Zellkulturen (117), an Membranen von Rattenherzen (66) und an Membranen von Rattenhirn (48).

Der Anteil der nachgewiesenen unspezifischen Bindung, die wir in Gegenwart von 10^{-5} M Alprenolol gemessen haben, beträgt sowohl an Herzmuskelmembranen als auch an Lungengewebe von Meerschweinchen etwa 50 %. Verglichen mit der Dissoziationskonstante von (-)Alprenolol, die je nach Bestimmungsmethode zwischen $1,57 \times 10^{-9}$ M und 6×10^{-9} M liegt (Tab. 4), wird die unspezifische Bindung bei einem 10 000fachen Überschuß des unmarkierten Liganden gemessen. Bei dieser hohen Konzentration muß man berücksichtigen, daß unter Umständen fälschlicherweise ein zu hoher Anteil spezifischer Bindungsstellen gemessen wird, insbesondere, wenn sich die Dissoziationskonstanten von spezifischen und unspezifischen Bindungsstellen nicht allzusehr unterscheiden. Maguire et al. (120) haben deshalb zur Messung der unspezifischen Bindung eine um den Faktor 100 höhere Konzentration des unmarkierten Liganden im Vergleich zur K_D vorgeschlagen; dabei würden ca. 99 % der spezifischen Bindungsstellen besetzt werden. Im Falle einer negativen Kooperativität würde dann allerdings der Anteil der unspezifischen Bindungsstellen überschätzt werden, während bei der hier ausgeführten Definition der Anteil an unspezifischer Bindung möglicherweise unterschätzt wird.

Die in der Literatur angegebenen Definitionen einer unspezifischen Bindung erscheinen andererseits willkürlich und uneinheitlich. So haben Kleinstein und Glossmann (81) die unspezifische Bindung von 125 J-Hydroxybenzylpindolol an solubilisierten Lungengewebsmembranen von Meerschweinchen in Gegenwart von 10^{-5} M Propranolol gemessen und dabei ca. 50 % der Ge-

samtbindung erhalten. Bei Bindungsversuchen von ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Membransuspensionen von Rattenherz und Rattenlunge betrug die unspezifische Bindung 30-40 % in Gegenwart von 10^{-3}M l-Isoprenalin (124) bzw. an Rattenherzen 25 % in Gegenwart von 10^{-6}M l-Isoprenalin (66). Barnett et al. (12) haben an der Rattenlunge den unspezifisch gebundenen Anteil von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol in Gegenwart von $2 \times 10^{-4}\text{M}$ Isoprenalin definiert und 90 % spezifische Bindung erhalten. An Membransuspensionen von Meerschweinchengehirn wurde eine unspezifische Bindung von 45-60 % in Gegenwart von 10^{-6}M l-Isoprenalin ermittelt (28), und an Membransuspensionen von Rattengehirn war sie 20-30 %, gemessen bei 10^{-6}M $(-)$ Alprenolol (29), wobei jeweils $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol als markierter Ligand eingesetzt wurde. An Erythrozytenmembranen und Zellkulturen war die unspezifische Bindung in der Regel nur 5-20 % (25, 94, 98, 117, 121, 130), gemessen bei 10^{-5}M ($\pm$)Propranolol (94, 121, 130), 10^{-7}M Hydroxybenzylpindolol (25), 10^{-5}M $(-)$ Alprenolol oder l-Isoprenalin (117), 10^{-6}M $(-)$ Alprenolol oder $(-)$ Propranolol (98). Interessanterweise konnten Pochet und Schmitt (140) bei Bindungsversuchen mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol an Zellkulturen von Muskelzellen die unspezifische Bindung (gemessen bei 10^{-7}M $(-)$ Propranolol) durch Phentolamin ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) deutlich reduzieren. Diesen Effekt der alphablockierenden Substanz konnten wir bei unseren Bindungsversuchen nicht nachweisen.

Wenngleich wir an Membransuspensionen, die wir nach dem von Drummond und Severson (50) modifizierten Verfahren präpariert haben, spezifische Bindungsstellen für $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol nachweisen konnten, muß doch einschränkend betont werden, daß bei Versuchen mit Membransuspensionen immer berücksichtigt werden muß, daß durch die Membranpräparation möglicherweise Veränderungen an der Zellmembranstruktur verursacht werden: Die Zellen werden aus dem physiologischen Zellverband herausgerissen, die Membranproteine können in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur verändert werden, können durch Bruch von Wasserstoff- und SH-Brückenbindungen oder Ladungsverschiebungen destabilisiert werden; sie werden einem anderen Ionenmilieu ausgesetzt und teilweise mit unphysiologischen Substanzen be-

handelt und inkubiert usw. Die mangelhafte Stabilität der nach Alexander und Lefkowitz (7) präparierten Herzmuskelmembranen von Meerschweinchen mit einer Abnahme der Bindungskapazität für $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol um 30 % innerhalb von 30 min und der fehlende Nachweis eines stereospezifischen Bindungsverhaltens von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an der nach Drummond und Severson (50) modifizierten Membranpräparation von Meerschweinchenherzen mit Anreicherung der Membran durch Lithiumbromid mögen hierin ihre Ursache haben.

Die konzentrationsabhängigen Bindungsversuche, die wir an den spezifischen Bindungsstellen für $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol bzw. ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol im Äquilibrium durchgeführt haben (Abb. 23-26), zeigen nach der Analyse von Scatchard (152) immer eine gekrümmte Kurve, wobei sowohl am Herzen als auch an der Lunge ein hochaffiner Rezeptor R_1 (K_D : $1,7 \times 10^{-9}\text{M}$ bis $6 \times 10^{-9}\text{M}$, vgl. Tab. 3) mit einer niedrigen Bindungskapazität (0,18 bis 1,4 pMole/mg Protein) von einem niederaffinen Rezeptor R_2 (K_D : $3,6 \times 10^{-8}\text{M}$ bis $4,3 \times 10^{-6}\text{M}$) mit einer hohen Bindungskapazität (5,2 bis 22,8 pMole/mg Protein) abgegrenzt werden kann. Während bei den Bindungsversuchen mit den beiden Liganden $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol und ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol am hochaffinen Rezeptor R_1 die Dissoziationskonstanten und die Bindungskapazitäten gut übereinstimmen, trifft dies nicht mehr in gleichem Maße für den niederaffinen Rezeptor R_2 zu. Dies mag mit den unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten beider Liganden zusammenhängen; andererseits stand als unmarkierter Ligand nur $(\pm)$ Pindolol und nicht $(\pm)$ Hydroxypindolol zur Verfügung. Der mit $(-)$ Alprenolol erhaltene Unterschied der Bindungskapazitäten von R_2 an Herz und Lunge ist wahrscheinlich methodisch bedingt (174).

Die beiden gemessenen Dissoziationskonstanten für R_1 und R_2 können durch unterschiedliche Konformationszustände des gleichen Rezeptors bzw. durch zwei morphologisch verschiedene Rezeptoren verursacht sein. Die gekrümmte Kurve nach der Auftragung nach Scatchard (152) kann jedoch auch Ausdruck einer negativen Kooperativität zwischen den beta-adrenergen Rezeptoren sein. Dabei nimmt nach der Definition von De Meyts et al. (46,

48) die Affinität der Rezeptoren zu den spezifischen Liganden bei zunehmender Rezeptorbesetzung ab. Der hochaffine Rezeptor R_1 , der ursprünglich an der Membran vorhanden ist, würde dann bei steigenden Konzentrationen von (-)Alprenolol durch Konformationsänderung über unendlich viele Zwischenstufen schließlich in den Rezeptor R_2 mit der niedrigsten Affinität übergehen. Für eine negative Kooperativität zwischen den Betarezeptoren spricht eine beschleunigte Abdissoziation von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol von seinen Bindungsstellen in Gegenwart von 10^{-6}M (-)Alprenolol (Abb. 19, 20). Die Dissoziationsreaktion haben wir in kinetischen Bindungsexperimenten bei einer Verdünnung von 1:100 mit und ohne unmarkiertes (-)Alprenolol gemessen. Eine scheinbare beschleunigte Abdissoziation durch eine zu niedrig gewählte Verdünnung, bei der in Abwesenheit des unmarkierten Liganden bereits vom Rezeptor abdissoziiertes $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol erneut an die Membran gebunden würde (Rebinding), konnten wir ausschließen durch Zugabe von "frischer" Membransuspension (diese besitzt nur unbesetzte Rezeptoren): Die Dissoziationsgeschwindigkeiten wurden dadurch nicht beeinflusst (Abb. 21). An den unspezifischen Bindungsstellen einer hitzedenaturierten Membran war bei diesen kinetischen Bindungsversuchen weder eine Dissoziation noch eine unterschiedliche Bindung von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol nachweisbar (Abb. 22).

Ebenfalls vereinbar mit einer negativen Kooperativität ist das initiale Bindungsmaximum, das wir bei allen unseren Assoziationsversuchen (Abb. 15, 16, 17) erhalten haben. Nach Besetzung einer maximalen Anzahl von Rezeptoren würde dann die Affinität erniedrigt werden, und bei konstant bleibender Konzentration der Liganden würde ein bestimmter abdissoziierter Anteil bei der veränderten Rezeptoraffinität nicht mehr gebunden werden können. Man erhielte dann eine Abnahme des insgesamt gebundenen $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolols bzw. ^{125}J -Hydroxybenzylpindolols, bis sich nach dem Massenwirkungsgesetz ein neues Gleichgewicht eingestellt hat. Das Äquilibrium liegt dabei im Plateaubereich, d.h. im stabilen Gleichgewichtszustand zwischen k_{+1} und k_{-1} . Ein Bindungsmaximum nach 1-2 min war auch bei der Assoziationsreaktion von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol an Zellkulturen von C6-Gliomazellen zu sehen (117); allerdings ergab hier ein konzen-

trationsabhängiger Bindungsversuch bei der Auftragung nach Scatchard (152) eine Gerade. An Membranen von Froscherythrozyten erhielt Lefkowitz (94) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C ebenfalls ein initiales Bindungsmaximum. Werden diese Membranen vorinkubiert, dann ist dieser Effekt jedoch nicht mehr vorhanden (111). An nicht vorinkubierten Membranen von Froscherythrozyten läßt sich ein negativ kooperatives Bindungsverhalten zwischen den beta-adrenergen Rezeptoren demonstrieren (111).

Sowohl eine gekrümmte Scatchard-Kurve als auch eine beschleunigte Dissoziation in Anwesenheit von 10^{-6} M (-)Alprenolol könnte durch eine Wechselwirkung zwischen den Liganden verursacht werden, wenn z.B. ein dabei entstandenes Polymer eine niedrigere Affinität zum Rezeptor hätte. Dieser Effekt scheint jedoch zwischen beta-adrenergen Substanzen im spezifischen Konzentrationsbereich ausgeschlossen zu sein, da Adrenalin und Noradrenalin erst ab einer Konzentration von 10^{-1} M polymerisieren sollen (176) und sowohl diese Catecholamine als auch beta-blockierende Pharmaka die Abdissoziation von (-)- 3 H-Dihydroalprenolol entsprechend ihrer Affinität zum Rezeptor beschleunigen (111).

Eine Heterogenität zwischen (-)Alprenolol und (-)- 3 H-Dihydroalprenolol als Ursache der gekrümmten Kurve bei der Auftragung nach Scatchard (152) konnte durch die Untersuchungen von Mukherjee et al. (129) weitgehend ausgeschlossen werden. Nach unseren Ergebnissen (beschleunigte Dissoziationsgeschwindigkeit bei hoher Rezeptorbesetzung, experimentell definierter Anteil der unspezifischen Bindung) ist es daher unwahrscheinlich, daß der niederaffine Rezeptor R_2 unspezifischen Bindungsstellen oder einem Artefakt entspricht bzw. daß der gekrümmte Scatchard-Plot durch eine infolge des Präparationsvorganges geschädigten Membranstruktur bedingt ist, wie das z.B. an Skelettmuskelmembranen von Ratten bei Bindungsversuchen mit g-Strophanthin (53) diskutiert wird.

Die gemessene beschleunigte Dissoziationsgeschwindigkeit in Anwesenheit des unmarkierten Liganden könnte auch erklärt werden durch einen unbewegten Flüssigkeitsfilm, der unabhängig vom Verdünnungsfaktor die Membranen umgibt und als Diffusionsbar-

riere wirkt ("unstirred layers"). Innerhalb dieser Schicht könnte der unmarkierte Ligand die Konzentration der markierten Substanz herabsetzen, wobei infolge deren herabgesetzten Diffusion dann eine beschleunigte Abdissoziation vorgetäuscht würde. Da jedoch nach den Berechnungen von Limbird und Lefkowitz (111) die Diffusionszeit für $(-)^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol zum Durchdringen der hypothetischen "unstirred layers" mit $1/4000$ s sehr kurz ist im Vergleich zur Abdissoziation vom Rezeptor, scheint die Diffusion keinen Einfluß auf die kinetischen Eigenschaften der beta-adrenergen Substanz zu haben. Am Insulinrezeptor von menschlichen Lymphozytenzellkulturen (46, 48) konnte dieses Phänomen ausgeschlossen werden, da an den gleichen Membranen eine beschleunigte Abdissoziation zwar von ^{125}J -Insulin in Gegenwart von unmarkiertem Insulin, nicht jedoch von ^{125}J -Wachstumshormon in Gegenwart von unmarkiertem Wachstumshormon nachweisbar war. Eine Analyse nach Scatchard (152) ergab bei Bindungsversuchen mit ^{125}J -Insulin eine gekürmte Kurve und mit ^{125}J -Wachstumshormon eine Gerade (48).

Eine negativ kooperative Wechselwirkung zwischen Insulinrezeptoren konnte z.B. an menschlichen Lymphozytenzellkulturen (46, 48) und an Leberzellmembranen von Meerschweinchen (47) nachgewiesen werden. Nach den Untersuchungen von De Meyts et al. (46, 48) wurde eine beschleunigte Abdissoziation von ^{125}J -Insulin bereits in Gegenwart von $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ Insulin deutlich; dies ist eine Konzentration, bei der dieser Effekt nicht durch Dimere im Sinne einer Wechselwirkung zwischen den Liganden hervorgerufen werden kann. Eine Polymerisation von Insulin tritt erst bei höheren Konzentrationen auf. Dementsprechend konnten Cuatrecasas und Hollenberg (42) an unspezifischen Strukturen wie Plazentamembran und Talcum in Gegenwart einer hohen Konzentration von Insulin ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$ bzw. 10^{-3} M) eine beschleunigte Abdissoziation von ^{125}J -Insulin nachweisen. Die kürzlich von Pollet et al. (141) veröffentlichten Ergebnisse über kinetische Bindungsexperimente an menschlichen Lymphozytenzellkulturen sind hingegen mit einer negativen Kooperativität nicht vereinbar. Nach einer 100fachen Verdünnung konnte dabei eine beschleunigte Abdissoziation von ^{125}J -Insulin, das in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt worden ist ($5 \times 10^{-11} \text{ M}$, $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, $2 \times 10^{-8} \text{ M}$), in Gegenwart von

$5 \times 10^{-9} \text{ M}$ Insulin auch unter den Bedingungen gemessen werden, unter denen die Rezeptorbesetzung nach Zugabe des unmarkierten Insulins insgesamt niedriger war als z.B. bei $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ $^{125} \text{ J}$ -Insulin in Abwesenheit von unmarkiertem Insulin.

Zwischen beta-adrenergen Rezeptoren konnte bisher zwar an Membranen von Froscherythrozyten (110, 111), nicht jedoch von Truthahnerythrozyten (25, 105, 122) eine negative Kooperativität gefunden werden. Limbird et al. (111) wiesen dabei an den Membranen von Froscherythrozyten bereits bei einer Rezeptorbesetzung von 5-10 % eine Abnahme der Affinität zum Liganden nach. Wenngleich die physiologische Bedeutung der negativen Kooperativität zwischen Membranrezeptoren (68) noch nicht sicher erklärbar ist, so könnte dadurch bei niedrigen Hormon- bzw. Pharmakonkonzentrationen eine größere Empfindlichkeit der Rezeptoren verursacht werden; vor der Dauerwirkung einer sehr hohen Ligandenkonzentration würde dagegen durch die dann erfolgende Affinitätserniedrigung ein gewisser Schutz bestehen.

Die Spezifität der durch $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol nachgewiesenen Bindungsstellen wird auch deutlich, wenn man die Affinität verschiedener beta-adrenerger Pharmaka mit ihrer physiologischen Wirksamkeit vergleicht. Entsprechend dem pharmakologischen Effekt in vivo haben an Herzmuskelmembranen von Meerschweinchen die Dissoziationskonstanten folgender Agonisten abgenommen: 1-Isoprenalin > 1-Adrenalin = 1-Noradrenalin (Tab. 5 A). Diese Bindungsstellen zeigen somit nach der Definition von Lands (90) die Eigenschaften von Beta_1 -Rezeptoren, wohingegen die am Lungengewebe von Meerschweinchen gemessenen Dissoziationskonstanten mit der Reihenfolge 1-Isoprenalin > 1-Adrenalin > 1-Noradrenalin (Tab. 5 A) Beta_2 -Rezeptoren zuzuordnen sind.

Mißt man darüber hinaus an Herzmuskelmembranen und am Lungengewebe von Meerschweinchen die Affinität einer Reihe anderer beta-adrenerger Pharmaka (Tab. 5 A und B), dann ergibt sich für keinen der verwendeten Liganden eine absolute Organspezifität. Die Dissoziationskonstanten der nur unmarkiert zur Verfügung stehenden beta-adrenergen Substanzen haben wir dabei aus dem EC_{50} -Wert nach der von Cheng und Prussoff (36) angegebenen

Gleichung berechnet. Von den untersuchten Agonisten (Tab. 5 A) zeigen Protokylol und die Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly eine um den Faktor 10 höhere Affinität zum Lungengewebe verglichen mit der Herzmuskelfmembran. Protokylol hat dabei als Agonist mit einer K_D von $3,4 \times 10^{-8} M$ am Lungengewebe eine ungewöhnlich hohe Affinität zu beta-adrenergen Rezeptoren, die von Kleinstein und Glossman (81) zwar an solubilisierten Membranrezeptoren ($K_D = 2 \times 10^{-8} M$), nicht jedoch an Membranpartikeln ($K_D = 1,7 \times 10^{-6} M$) von Meerschweinchenlunge bestätigt werden konnte. Die an unserer Herzmuskelfmembran gemessenen Dissoziationskonstanten für die Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly und Protokylol stimmen mit denen an Membranen von Froscherythrozyten (130) gut überein. Eine relative Kardioselektivität fanden wir bei keinem der untersuchten Agonisten. Von den getesteten Antagonisten (Tab. 5 B) zeigte die Versuchssubstanz H 35/25 der Fa. Hassle, die dem beta₂-selektiven Antagonisten Butoxamin chemisch verwandt ist, zum Lungengewebe eine 10fach höhere Affinität als zur Herzmuskelfmembran. Die als "kardioselektiv" bezeichneten Betablocker Atenolol und Metoprolol weisen tatsächlich eine höhere Affinität zu Herzmuskelfmembranen als zum Lungengewebe auf. Diese Organselektivität war bei Bindungsversuchen mit ¹²⁵J-Hydroxybenzylpindolol mit einer um den Faktor 100 unterschiedlichen K_D an Herz und Lunge wesentlich deutlicher als bei Verwendung von (-)-³H-Dihydroalprenolol; dies ist wahrscheinlich auf die erheblich höhere spezifische Radioaktivität von ¹²⁵J-Hydroxybenzylpindolol zurückzuführen. Bei entsprechenden Bindungsversuchen an Herzmuskel- und Lungengewebsmembranen von Ratten (124) konnte ebenfalls eine, wenn auch geringere "Kardioselektivität" von Atenolol und Metoprolol nachgewiesen werden; die Versuchssubstanz H 35/25 der Fa. Hassle zeigte hier im Gegensatz zu unseren Meßdaten keine unterschiedliche Affinität. Die Bindungseigenschaften von Agonisten an den Membranpräparationen der Ratte stimmen mit unseren Ergebnissen im wesentlichen überein, wobei an Herzmuskelfmembranen ebenfalls Beta₁-Rezeptoren und am Lungengewebe Beta₂-Rezeptoren zu überwiegen scheinen. Die untersuchten beta-adrenergen Pharmaka binden sich also sowohl an Beta₁-Rezeptoren als auch an Beta₂-Rezeptoren von Meerschweinchen, wobei eini-

ge Liganden eine unterschiedliche Affinität zu Herz und Lunge aufweisen. Je nach der Selektivität dieser beta-adrenergen Pharmaka und dem Verteilungsmuster von Beta₁- und Beta₂-Rezeptoren an den einzelnen Organen wird eine unterschiedliche K_D mehr oder weniger ausgeprägt sein. So wird verständlich, daß der selektive Beta₂-Agonist Salbutamol mit einer nur geringgradig unterschiedlichen Affinität an Herzmuskelmembranen (K_D: 7,9 x 10⁻⁶M) und Lungengewebe (K_D: 2,1 x 10⁻⁶M) von Meer-schweinchen gebunden wird.

Es ist heute allgemein anerkannt, daß an einem Organ prinzipiell Beta₁- und Beta₂-Rezeptoren gemeinsam vorhanden sein können und daß die unterschiedliche pharmakologische Spezifität der jeweiligen Substanzen durch ein wechselndes Verteilungsmuster von Beta₁- und Beta₂-Rezeptoren an den einzelnen Organen verursacht wird (31, 135). Neuerdings versuchen mehrere Arbeitsgruppen, durch eine besondere grafische Auftragung der experimentellen Daten und durch eine computertechnische Auswertung nichtlinearer Regressionskurven (64, 125, 150) das Verteilungsmuster der verschiedenen Betarezeptoren genauer aufzuschlüsseln. Möglicherweise gelingt dadurch eine quantitative Analyse der unterschiedlichen Rezeptoren besser.

Da die durch beta-adrenerge Pharmaka hervorgerufenen biologischen Antworten über eine Aktivitätsänderung der mit den Betarezeptoren gekoppelten Adenylatzyklase vermittelt werden (26, 96, 97, 120, 121), stellt sich die Frage nach dem Kopplungsmechanismus zwischen spezifischem Rezeptor und Enzym. Wir haben nun an denselben Membransuspensionen einerseits die Affinität von Antagonisten und Agonisten zum spezifischen Betarezeptor und andererseits die dadurch bewirkte Aktivitätshemmung der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklase bzw. deren Aktivitätssteigerung gemessen. Die nach Gilman et al. (120, 121) aus unseren Versuchsergebnissen berechnete Inhibitionskonstante K_I von (-)Alprenolol, die danach weitgehend unabhängig ist von der eingesetzten Isoprenalin- und Gpp(NH)p-Konzentration, und die gemessenen Dissoziationskonstanten K_D von (-)Alprenolol sind innerhalb eines experimentellen Streubereichs identisch

und liegen im Bereich von 10^{-9} M (Tab. 6). Das Ergebnis $K_D = K_I$ ist verständlich, da beta-adrenerge Antagonisten die Isoprenalin-stimulierte Adenylatzyklase ausschließlich durch die Verdrängung des Agonisten vom Betarezeptor hemmen. Die weitgehende Übereinstimmung von K_D und K_I verschiedener Antagonisten wurde auch am Betarezeptor-Adenylatzyklase-System anderer Gewebe nachgewiesen, z.B. an Lymphozytenzellkulturen (120), Gliomazellkulturen von Ratten (121), Rattenerythrozyten (77), Rattenhirn (49), Rattenherz (66, 124), Rattenlunge (124), Truthahnerythrozyten (26), Froscherythrozyten (94, 98, 130). Es gibt jedoch auch Berichte über unterschiedliche K_D - und K_I -Werte, wie etwa von Propranolol an Truthahnerythrozyten (17) oder ($\pm$)Alprenolol am Rattenherzen (66).

Untersuchungen über Struktur einerseits und Affinität sowie der intrinsischen sympathomimetischen Aktivität andererseits (130) haben ergeben, daß die Bindung an den Rezeptor und das Ausmaß der Adenylatzyklaseaktivierung durch verschiedene Strukturmerkmale bedingt sind. So wird die Bindungsaffinität vor allem durch die Stereokonfiguration der β -Carbonhydroxylgruppe und die Größe des Substituenten am Aminostickstoff bestimmt. Die Substituenten am Catecholring hingegen sind für die partiell agonistische Aktivität verantwortlich (130). Dementsprechend wurden abhängig vom jeweiligen Agonisten und Gewebe ganz unterschiedliche Verhältnisse von K_D und K_{act} gefunden (120). Eine weitgehende Übereinstimmung dieser beiden Konzentrationen wurde für die untersuchten Agonisten an Membranen von Froscherythrozyten gemessen (98, 127, 130), ebenso am Rattenhirn (49), an Rattengliomazellen (121), an Rattenerythrozyten (77) und an menschlichen Lymphozyten (180). Im Gegensatz dazu haben Lucas und Bochaert (117) an C6-Gliomazellkulturen ein Verhältnis $K_D/K_{act} = 3$ nachgewiesen; allerdings wurde die Besetzung aller spezifischen Rezeptoren und die maximale Enzymaktivität wiederum nur bei der gleichen Konzentration von l-Isoprenalin (10^{-5} M) gemessen. In ähnlicher Weise konnte an isolierten Fettzellen (164) eine 50%ige Stimulation der O_2 -Aufnahme bereits dann nachgewiesen werden, wenn nur ca. 10 % der Betarezeptoren mit l-Isoprenalin besetzt waren. Aufgrund der-

artiger Ergebnisse wurde die Existenz von "spare receptors" postuliert, die am Papillarmuskel von Katzen (168) durch die Verwendung eines irreversiblen beta-adrenergen Antagonisten (NHNp-NBE) direkt nachgewiesen werden konnten. Mit 1-Isoprenalin war nach Besetzung von weniger als 10 % der gesamten beta-adrenergen Rezeptoren eine maximale Stimulierung der Adenylatzyklase und ein maximaler positiv inotroper Effekt erreicht worden. An Zellkulturen von VA₂-Zellen (die von menschlichem Lungengewebe abstammen) (168) und Varianten von S 49-Lymphomzellen (76) nahm hingegen die durch 1-Isoprenalin maximal erreichbare Aktivität der Adenylatzyklase in dem Maße ab, in dem die Anzahl der Betarezeptoren vermindert worden ist. Eine schlechtere Kopplung ($K_D/K_{act} < 1,0$) von Rezeptoren und Enzym wurde an Membranen von Rattenherzen (66) gefunden; für mehrere Agonisten (1-Isoprenalin, 1-Adrenalin, 1-Noradrenalin) wurde dort eine um 1-2,5 Zehnerpotenzen niedrigere K_D gemessen, verglichen mit der Konzentration, welche die Adenylatzyklase halbmaximal stimulierte. In unseren Versuchen an Herzmuskel- und Lungengewebsmembranen von Meerschweinchen konnten wir mit 1-Isoprenalin nur eine geringfügige, jedoch signifikante, konzentrationsabhängige Zunahme der Adenylatzyklaseaktivität (0,2 Nanomole/mg x 10 min) messen (Abb. 39); die Dissoziationskonstante (K_D) für 1-Isoprenalin (aus Bindungsexperimenten bestimmt) war dabei $1,35-2,5 \times 10^{-7} M$ (Tab. 5 A). In Gegenwart von $\geq 11,5 \mu M$ Gpp(NH)p hingegen konnte die Enzymaktivität durch 1-Isoprenalin ($10^{-5} M$) auf 0,7 Nanomole/mg x 10 min gesteigert werden (Abb. 39). Die Dissoziationskonstante (K_D) von 1-Isoprenalin in Gegenwart von Gpp(NH)p (100 μM) war jedoch um etwa den Faktor 60 größer ($10^{-6} M$) als ohne Nukleotide im Inkubationsvolumen (Abb. 40, 41). In Abwesenheit von Gpp(NH)p ergibt sich somit ein Verhältnis $K_D/K_{act} = 1$, was auf ein gutes Kopplungsverhältnis rückschließen läßt (120). Die Dissoziationskonstante von Antagonisten wurde durch Gpp(NH)p nicht beeinflusst. Der Effekt von Nukleotiden auf die Aktivität der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklase bzw. das Bindungsverhalten des Agonisten am Betarezeptor konnte bereits an verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, z.B. an Membranpräparationen von Lymphozytenzellkulturen (72, 120, 148), Froscherythrozyten (99, 102, 115), Truthahnerythrozyten (10, 18, 26),

Taubenerythrozyten (138), Fettzellen von Ratten (67, 115).

Aufgrund derartiger Versuchsergebnisse haben Rodbell et al. (147) ein nukleotidbindendes Protein als regulatorischer Einheit zwischen dem Hormonrezeptor und der Adenylatzyklase postuliert. Pfeuffer (137) gelang kürzlich an Membranen von Taubenerythrozyten der biochemische Nachweis eines nukleotidbindenden Proteins. Das Kopplungsprotein von Betarezeptoren und Adenylatzyklase regelt möglicherweise die Stimulierung der Adenylatzyklase durch Hormone, die an morphologisch verschiedene Rezeptoren gebunden werden. Darüber hinaus dürfte die Wirkung und Einordnung von beta-adrenergen Pharmaka in Agonisten, partielle Agonisten und Antagonisten hier begründet sein. Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus beta-adrenerger Pharmaka wird es letztlich nötig sein, die einzelnen Bestandteile des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems zu isolieren und dann wieder funktionell zusammenzusetzen.

Das Verständnis des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems ist unumgänglich zur Beurteilung von Wirkung und Nebenwirkung beta-adrenerger Pharmaka. Zur Therapie von Hypertonie, hyperkinetischem Herzsyndrom, Angina pectoris und den Symptomen bei Hyperthyreose (21, 78, 89, 104) kennt man beispielsweise eine Vielzahl von Betarezeptorenblockern, und zur Behandlung von Asthma bronchiale, Bradykardie und bei Schocksymptomatik (60) stehen mehrere Catecholamine zur Verfügung, wobei diese Pharmaka zum Teil sehr unterschiedliche pharmakodynamische Eigenschaften besitzen mit Unterschieden bezüglich der intrinsischen Aktivität, der kardiodepressiven oder kardioselektiven Wirkung und der Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion. Bei einer Reihe der genannten Erkrankungen ergeben sich dabei Hinweise auf Veränderungen am Betarezeptor-Adenylatzyklase-System. So konnte bei Ratten mit hyperthyreoter Stoffwechsellage eine Zunahme (37, 178) und bei Hypothyreose eine Abnahme (37) funktioneller Betarezeptoren am Herzen gemessen werden. Eine ca. 50%ige Abnahme sowohl beta-adrenerger als auch alpha-adrenerger Rezeptoren konnte bei hypertonen Ratten zwar am Herzen,

nicht jedoch an der Lunge oder Niere gemessen werden (183). Bei Hypertonie würde es sich nach diesem Befund um eine spezifische Zunahme der Sympathikusaktivität am Herzen und damit einhergehende Desensibilisierung an diesem Organ handeln. Hinweise für eine Zunahme beta-adrenerger Rezeptoren ergaben sich beim insuffizienten Herzen und bei manchen Formen kardialer Hypertrophie (109). Möglicherweise handelt es sich hierbei um den gegenteiligen Effekt, da bei diesen Erkrankungen eine verminderte Catecholaminkonzentration im Herzgewebe gemessen wurde (109). Demgegenüber konnte bei Asthmatikern und bei Kontrollpersonen mit chronischer Einnahme von Sympathomimetika als Ausdruck einer Desensibilisierung eine Abnahme von Betarezeptoren an Lymphozyten nachgewiesen werden (39). Darüber hinaus konnte bei Tierversuchen mit experimentell induziertem Asthma eine Abnahme beta-adrenerger und gleichzeitig eine Zunahme alpha-adrenerger Rezeptoren gemessen werden (11).

Andere Erkrankungen wiederum werden durch Substanzen hervorgerufen, welche die Adenylatzyklaseaktivität nicht durch Bindung an den beta-adrenergen Rezeptor beeinflussen. Das Cholera-toxin beispielsweise hemmt die Catecholamin-stimulierte GTPase und bewirkt dadurch - ähnlich wie die Exotoxine von Colibakterien - eine irreversible Stimulierung der Adenylatzyklase (34, 158).

Eine gezielte Behandlung derartiger Erkrankungen wird nur möglich sein, wenn man weiß, welche Störung des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems vorliegt und über welche Mechanismen Pharmaka die Aktivität der Adenylatzyklase beeinflussen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Konzept der Alpha-, Beta₁- und Beta₂-Rezeptoren wurde durch klassische pharmakologische Untersuchungen geschaffen. Durch die Entwicklung radioaktiv markierter, hochaffiner Betarezeptorenblocker ist der direkte biochemische Nachweis spezifischer Bindungsstellen gelungen. Man weiß heute, daß die durch beta-adrenerge Pharmaka hervorgerufenen biologischen Antworten, wie z.B. die positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen, über eine Aktivitätsänderung der mit dem Betarezeptor gekoppelten Adenylatzyklase vermittelt werden. Der genaue Wirkungsmechanismus ist dabei noch weitgehend unklar. Sowohl beta-adrenerge Agonisten als auch Antagonisten besetzen mit hoher Affinität und Selektivität den Betarezeptor, aber nur durch die Bindung von Agonisten, wie z.B. Isoprenalin, wird die Adenylatzyklase aktiviert. Betarezeptoren-blockierende Substanzen verdrängen aufgrund eigener, meist höherer Affinität die beta-adrenergen Agonisten aus der Rezeptorbindung und hemmen dadurch die Aktivierung der Adenylatzyklase.

Da eine Therapie mit Betarezeptor-blockierenden Substanzen heute bei einer Vielzahl von Krankheiten (Hypertonie, hyperkinetischem Herzsyndrom, Angina pectoris, Symptomen bei Hyperthyreose) vorgeschlagen wird und beta-adrenerge Agonisten z.B. zur Behandlung von Asthma bronchiale, Schock und Bradykardie eingesetzt werden und das Verständnis des Betarezeptor-Adenylatzyklase-Systems dementsprechend für die Beurteilung von Wirkung und Nebenwirkung unumgänglich ist, haben wir dieses Pharmakon-Rezeptor-System an Herzmuskel- und Lungengewebsmembranen von Meerschweinchen näher untersucht. Als radioaktiv markierte beta-adrenerge Antagonisten standen uns (-)-³H-Dihydroalprenolol und ¹²⁵I-Hydroxybenzylpindolol zur Verfügung. Durch die hier gezeigten Versuche wollten wir spezifische Bindungsstellen für (-)-³H-Dihydroalprenolol an Membranpräparationen von Herzmuskel- und Lungengewebe von Säugtieren experimentell nachweisen und quantifizieren sowie die

Eigenschaften dieser Rezeptoren darstellen. Eine mögliche kardioselektive Bindung einer Reihe beta-adrenerger Substanzen sollte untersucht und eine Korrelation zwischen Rezeptorbesetzung und Änderung der Adenylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden.

1. Spezifische Bindungsstellen für $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol

Durch in vivo-Untersuchungen hat man zum Nachweis einer spezifischen Pharmakon-Betarezeptor-Bindung folgende theoretische Kriterien aufgestellt: Die Bindung muß schnell, reversibel, stereospezifisch, von hoher Affinität und sättigbar sein. An den unspezifischen Bindungsstellen, die durch Bindungsexperimente an Glasfaserfiltern ohne Zugabe von nativer Membransuspension dargestellt wurden, konnten wir zwar eine rasche und reversible Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol zeigen; eine Stereospezifität war jedoch nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten wir in Gegenwart von nativer Membransuspension (modifizierte Membranpräparation nach Drummond und Severson) die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol durch $(-)$ - und $(+)$ Alprenolol stereospezifisch hemmen, und zwar in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} bis 10^{-5} M. Die Aktivität der Isoprenalin-stimulierten Adenylatzyklase war an der gleichen Membransuspension durch Alprenolol in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-3} M ebenfalls stereospezifisch hemmbar. Die Verschiebung der Dosis-Antwort-Kurve der Adenylatzyklase in einen höheren Konzentrationsbereich ist durch die Anwesenheit von l-Isoprenalin (10^{-6} M) und Gpp(NH)p (10^{-5} M) erklärbar. An einer hitzedenaturierten Membran, die wir 23 h bei 37°C inkubiert hatten, wurde die Bindung von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol erst in Gegenwart einer Konzentration größer als 10^{-5} M Alprenolol gehemmt. Erwartungsgemäß konnte an der hitzedenaturierten Membran kein stereospezifisches Bindungsverhalten von $(-)-^3\text{H}$ -Dihydroalprenolol mehr nachgewiesen werden. Die Stereospezifität ist somit das wichtigste Kriterium zum Nachweis spezifischer beta-adrenerger Bindungsstellen.

2. Darstellung von Eigenschaften der Betarezeptoren und deren Quantifizierung

Die Dissoziationskonstanten radioaktiv markierter beta-adrenerger Antagonisten wurden durch deren konzentrationsabhängige Bindung an den Betarezeptor unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt. Die grafische Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard ergab einen gekrümmten Kurvenverlauf, und mit Hilfe eines Computerprogramms konnten die Dissoziationskonstanten von mindestens zwei verschiedenen Rezeptoren errechnet werden; ein hochaffiner Rezeptor R_1 mit einer K_D von $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ am Herzen und einer K_D von $3,3 \times 10^{-9} \text{ M}$ an der Lunge bei Bindungsversuchen mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol sowie einer K_D von $1,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ am Herzen und $2,85 \times 10^{-9} \text{ M}$ an der Lunge bei den Versuchen mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol und ein niederaffiner Rezeptor R_2 mit einer K_D im Bereich von 10^{-6} M bis 10^{-8} M ($4,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ am Herzen und $8,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ an der Lunge bei den Bindungsversuchen mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol, $3,27 \times 10^{-8} \text{ M}$ am Herzen, $3,6 \times 10^{-8} \text{ M}$ an der Lunge bei den entsprechenden Versuchen mit ^{125}J -Hydroxybenzylpindolol. Die Bindungskapazität des niederaffinen Rezeptors, mit $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol bestimmt, beträgt das 100fache des hochaffinen Rezeptors.

Aufgrund unserer Untersuchungen konnte die Wahrscheinlichkeit aufgezeigt werden, daß der gekrümmte Scatchard-Plot Ausdruck einer negativen Kooperativität zwischen den Rezeptormolekülen ist, d.h. daß die Affinität der Rezeptoren zu den beta-adrenergen Pharmaka mit zunehmender Rezeptorbesetzung abnimmt. Dafür spricht die beschleunigte Abdissoziation von $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol vom Rezeptor in Gegenwart von unmarkiertem $(-)\text{Alprenolol}$ bei Verdünnungsexperimenten mit und ohne Zugabe des unmarkierten Liganden bei einer Verdünnung von 1:100. Diese beschleunigte Abdissoziation wurde nicht beeinflusst durch die Zugabe von "frischer" Membransuspension zum Inkubationsvolumen nach der Verdünnung und konnte nur an spezifischen beta-adrenergen Bindungsstellen nachgewiesen werden. Ebenfalls vereinbar mit einer negativen Kooperativität ist das initiale

Bindungsmaximum, das bei allen Assoziationsversuchen gezeigt werden konnte.

3. Untersuchungen über ein selektives Bindungsverhalten beta-adrenerger, nicht radioaktiv markierter Substanzen

Aus konzentrationsabhängigen Bindungsversuchen mit beta-adrenergen Substanzen, die nur unmarkiert zur Verfügung stehen, wurde aus dem EC_{50} -Wert die Dissoziationskonstante bestimmt. Bei dem Vergleich der Dissoziationskonstanten einer Reihe beta-adrenerger Pharmaka an Herz und Lunge von Meerschweinchen konnten wir keine absolute Organspezifität nachweisen. Eine höhere Affinität zu Lungengewebsmembranen zeigten die Agonisten Protokylol und die Versuchssubstanz 46 868 der Fa. Lilly sowie der Antagonist H 35/25 der Fa. Hassle. Die als "kardio-selektiv" bezeichneten Betablocker Atenolol und Metoprolol hatten eine niedrigere Dissoziationskonstante (= höhere Affinität) an der Herzmuskelmembran als am Lungengewebe.

4. Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Änderung der Adenylatzyklaseaktivität

Durch die Korrelation von Bindung eines beta-adrenergen Pharmakons an den Rezeptor und der gleichartigen Änderung der Adenylatzyklaseaktivität konnten wir zeigen, daß wir das biologisch relevante Betarezeptor-Adenylatzyklase-System dargestellt haben: Die an derselben Membransuspension gemessene spezifische Bindung von (-)Alprenolol und die dadurch hervorgerufene Hemmung der Adenylatzyklaseaktivität zeigten ein konstantes Verhältnis mit $K_D = K_I = 10^{-9}$ M, und sowohl die Bindung von (-)- 3H -Dihydroalprenolol als auch die Adenylatzyklaseaktivität waren in einem entsprechenden Konzentrationsbereich stereospezifisch hemmbar.

Nukleotide beeinflussen die Bindung von Agonisten an den Betarezeptor und die Enzymaktivität der Adenylatzyklase unterschiedlich. So wurde in Gegenwart von $\geq 11,5 \mu M$ Gpp(NH)p die Adenylatzyklaseaktivität durch 1-Isoprenalin maximal stimuliert (0,7 Nanomole/mg x 10 min), wohingegen in Abwesenheit

von Gpp(NH)p die Aktivität des Enzyms durch Isoprenalin konzentrationsabhängig nur bis auf 0,2 Nanomole/mg x 10 min gesteigert werden konnte. Im Gegensatz dazu erniedrigte Gpp(NH)p (100 μ M) die Affinität des beta-adrenergen Rezeptors zu Agonisten wie z.B. l-Isoprenalin um das 100fache.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, an Zellmembranpräparationen die Affinität verschiedener Betarezeptorenblocker zu ihren spezifischen Rezeptoren mit verhältnismäßig einfachen Mitteln reproduzierbar zu messen und Aussagen über die Eigenschaften verschiedener beta-adrenerger Pharmaka zu treffen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONS, R.D., NIES, A.S., GAL, J., HEGSTPAND, L.P., and MOLINOFF, P.B.: Elevation of β -Adrenergic Receptor Density in Human Lymphocytes after Propranolol Administration. *J. Clin. Invest.* 65, 949-957 (1980)
2. ADLERMANN, E.L., COLFART, D.J., WETTACH, G.E., HARRISON, D.C.: Coronary Artery Syndromes after Sudden Propranolol Withdrawal. *Am. Intern. Med. Sci.* 81, 625-631 (1974)
3. AHLQUIST, R.P.: A Study of the Adrenotropic Receptors. *Am. J. Physiol.* 153, 586-600 (1948)
4. AHLQUIST, R.P.: Adrenergic Beta-Blocking Agents. *Progr. Drug Res.* 20, 27-42 (1976)
5. AKERA, T.: Membrane Adenosinetriphosphatase: A Digitalis Receptor? *Science* 198, 569-574 (1977)
6. ALBERTSON, P.A.: Partition of Cell Particles and Makromolecules in Polymer Two-Phase Systems. In: *Advanc. Protein Chem.* 24, 309-341 (1970)
7. ALEXANDER, R.W., WILLIAMS, L.F., LEFKOWITZ, R.J.: Identification of Cardiac β -Adrenergic Receptors by $(-)[^3\text{H}]$ -Alprenolol Binding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1564-1568 (1975)
8. ATLAS, D., STEER, M.L., LEVITZKI, A.: Affinity Label for β -Adrenergic Receptors in Turkey Erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 1921-1925 (1976)
9. AURBACH, G.D., FEDAK, S.A., WOODARD, C.J., PALMER, J.S., HAUSER, D., TROXLER, F.: β -Adrenergic Receptor: Stereospecific Interaction of Iodinated β -Blocking Agent with High Affinity Site. *Science* 186, 1223-1224 (1974)
10. AURBACH, G.D., SPIEGEL, A.M., and GARDNER, J.D.: β -Adrenergic Receptors, Cyclic AMP, and Ion Transport in the Avian Erythrocyte. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 117-132 (1975)
11. BARNES, P.J., DOLLERY, C.T., and MAC DERMOT, J.: Increased Pulmonary α -Adrenergic and Reduced β -Adrenergic Receptors in Experimental Asthma. *Nature* 285, 569-571 (1980)
12. BARNETT, D.B., RUGG, E.L., and NAHORSKI, S.R.: Direct Evidence of Two Types of Betaadrenoceptor Binding Site in Lung Tissue. *Nature* 273, 166-168 (1978)
13. BATAILLE, D., FREYCHET, P., and ROSSELIN, G.: Interaction of Glucagon, Vasoactive Intestinal Polypeptide and Secretin with Liver and Fat Cell Membranes: Binding to Specific Sites and Stimulation of Adenylate Cyclase. *Endocrinology* 95, 713-721 (1974)
14. BAULIEU, E.-E.: Commentary. Steroid Receptors and Hormone Receptivity: New Approaches in Pharmacology and Therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1743-1748, Pergamon Press (1975)

15. BENFEY, B.G.: Cardiac Adrenoceptors at Low Temperature and the Adrenoceptor Interconversion Hypothesis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 57, 771-777 (1979)
16. BENNETT, V., CUATRECASAS, P.: Mechanism of Activation of Adenylate Cyclase by Vibrio Cholerae Enterotoxin. J. Membr. Biol. 22, 29-52 (1975)
17. BILEZIKIAN, J.P., AURBACH, G.D.: A β -Adrenergic Receptor of the Turkey Erythrocyte. J. Biol. Chem. 248, 5575-5583 (1973)
18. BILEZIKIAN, J.P., AURBACH, G.D.: The Effects of Nucleotide on the Expression of β -Adrenergic Adenylate Cyclase in Membranes from Turkey Erythrocytes. J. Biol. Chem. 249, 157-161 (1974)
19. BIRNBAUMER, L.: Hormone Sensitive Adenylate Cyclases: Useful Models for Studying Hormone Receptor Functions in Cell-Free Systems. Biochim. Biophys. Acta 300, 129-158 (1973)
20. BOEYNAEMS, J.M., and DUMONT, J.E.: Quantitative Analysis of the Binding of Ligands to their Receptors. J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 123-142 (1975)
21. BOLTE, H.-D.: Therapie mit Beta-Rezeptorenblockern. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1979)
22. BRISTOW, M., SHERROD, T.P., and GREEN, R.D.: Analysis of Beta-Receptor Drug Interactions in Isolated Rabbit Atrium, Aorta, Stomach and Trachea. J. Pharmacol. Exp. Ther. 171, 52-61 (1970)
23. BRODDE, O.-E., SCHÜMANN, H.-J., and WAGNER, J.: Decreased Responsiveness of the Adenylate Cyclase System on Left Atria from Hypothyroid Rats. Mol. Pharmacol. 17, 180-186 (1980)
24. BROOKS, St. M., Mc GOWAN, K., BERNSTEIN, L., ALTENAU, P., and PEAGLER, J.: Relationship between Numbers of Beta-Adrenergic Receptors in Lymphocytes and Disease Severity in Asthma. J. Allergy Clin. Immun. 63, 401-406 (1979)
25. BROWN, E.M., AURBACH, G.D., HAUSER, D., and TROXLER, F.: β -Adrenergic Receptor Interactions: Characterization of Jodohydroxybenzylpindolol as a Specific Ligand. J. Biol. Chem. 251, 1232-1238 (1976)
26. BROWN, E.M., FEDAK, S.A., WOODARD, C.J., AURBACH, G.D.: β -Adrenergic Receptor Interactions: Direct Comparison of Receptor Interaction and Biological Activity. J. Biol. Chem. 251, 1239-1246 (1976)
27. BRUNETTE, D.M., and TILL, J.E.: A Rapid Method for the Isolation of L-Cell Surface Membranes Using an Aqueous Two-Phase Polymer System. J. Membr. Biol. 5, 215-224 (1971)

28. BYLUND, D.B.: β -Adrenergic Receptor Binding in Guinea Pig Cerebral Cortex. *Brain Res.* 152, 391-395 (1978)
29. BYLUND, D.B., and SNYDER, S.H.: Beta Adrenergic Receptor Binding in Membrane Preparations from Mammalian Brain. *Mol. Pharmacol.* 12, 568-580 (1976)
30. CALABRO, M.A., and MAC LEOD, R.M.: Binding of Dopamine to Bovine Anterior Pituitary Gland Membranes. *Neuroendocrinology* 25, 32-46 (1978)
31. CARLSSON, E., ABLAD, B., BRANDSTROM, A., and CARLSSON, B.: Differentiated Blockade of the Chronotropic Effects of Various Adrenergic Stimuli in the Cat Heart. *Life Sci.* 11, 953-958 (1972)
32. CARON, M.G., BEAULIEU, M., RAYMOND, V., GAGNÉ, B., DROUIN, J., LEFKOWITZ, R.J., and LABRIE, F.: Dopaminergic Receptors in the Anterior Pituitary Gland. *J. Biol. Chem.* 253, 2244-2253 (1978)
33. CASSEL, D., and SELINGER, Z.: Catecholamine-stimulated GTPase Activity in Turkey Erythrocyte Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 538-551 (1976)
34. CASSEL, D., and SELINGER, Z.: Mechanism of Adenylate Cyclase Activation by Cholera toxin. Inhibition of GTP Hydrolysis at the Regulatory site. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 3307-3311 (1977)
35. CHARNES, M.E., BYLUND, D.B., BECKMANN, B.S., HOLLENBERG, M.D., and SNYDER, S.H.: Independent Variation of β -Adrenergic Receptor Binding and Catecholamine Stimulated Adenylate Cyclase Activity in Rat Erythrocytes. *Life Sci.* 19, 243-250 (1976)
36. CHENG, Y.C., and PRUSOFF, W.H.: Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor which Causes 50 Percent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108 (1973)
37. CIRALDI, T.P., and MARINETTI, G.V.: Hormone Action at the Membrane Level. VIII Adrenergic Receptors in Rat Heart and Adipocytes and their Modulation by Thyroxine. *Biochim. Biophys. Acta* 541, 334-346 (1978)
38. COLLUM, V.A., FARMER, J.B., JACK, D., and LEVY, G.P.: Salbutamol: A New Selective β -Adrenoceptive Receptor Stimulant. *Br. J. Pharmacol.* 35, 141-151 (1969)
39. CONOLLY, M.E., GREENACRE, J.K.: The Lymphocyte β -Adrenoceptor in Normal Subjects and Patients with Bronchial Asthma. *J. Clin. Invest.* 58, 1307-1316 (1976)
40. CUATRECASAS, P.: Insulin Receptor of Liver and Fat Cell Membranes. *Fed. Proc.* 32, 1838-1846 (1973)
41. CUATRECASAS, P.: Membrane Receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 169-214 (1974)

42. CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D.: Binding of Insulin and other Hormones to Non-Receptor Materials: Saturability, Specificity and Apparent "Negative Cooperativity". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 62, 31-41 (1975)
43. CUATRECASAS, P., and HOLLENBERG, M.D.: Membrane Receptors and Hormone Action. In: *Adv. in Protein Chem.* 30, 251-451 (1976)
44. CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D., CHANG, K.-J., and BENNET, V.: Hormone Receptor Complexes and their Modulation on Membrane Function. *Recent. Proc. Horm. Res.* 31, 37-68 (1975)
45. DALE, H.H.: On Some Physiological Actions of Ergot. *J. Physiol. (Lond.)* 34, 163-206 (1906)
46. DE MEYTS, P.: Cooperative Propertis of Hormone Receptors in Cell Membranes. *J. Supramol. Struct.* 4, 241-258 (1976)
47. DE MEYTS, P., KAHN, C.R., GINSBERG, B., and ROTH, J.: The Insulin Receptor: Greater Evelutionary Stability than Insulin. *Diabetes* 24 (Suppl. 2), 293 (1975)
48. DE MEYTS, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M.Jr., GAVIN, J.R., III, and LESNIAK, M.A.: Insulin Interactions with its Receptors: Experimental Evidence for Negative Cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55, 154-161 (1973)
49. DOLPHIN, A., ADRIEN, J., HAMON, M., and BOCKAERT, J.: Identity of [³H]-Dihydroalprenolol Binding Sites and β -Adrenergic Receptors Coupled with Adenylate Cyclase in the Central Nervous System: Pharmacological Properties, Distribution and Adaptive Responsiveness. *Mol. Pharmacol.* 15, 1-15 (1979)
50. DRUMMOND, G.J., SEVERSON, D.L.: Preparation and Characterization of Adenylate Cyclase from Heart and Skeletal Muscle. In: *Methods in Enzymology* (Vol. 38) (Hardman, J.G., O'Malley, B.W., eds.), Acad. Press, New York - San Francisco - London, 143-149 (1974)
51. EHRLICH, P.: On Partial Functions of the Cell; Nobel Lecture: In the Collected Papers of P. Ehrlich, Vol. III, 183 (F. Himmelweit, M. Marquardt, and H. Dale, eds.). Pergamon Press, Oxford (1956)
52. ERDMANN, E.: Cell Membrane Receptors for Cardiac Glycosides in the Heart. *Basic Res. Cardiol.* 72, 315-325 (1977)
53. ERDMANN, E., PHILIPP, G., TANNER, G.: Ouabain-Receptor Interaction in (Na^+ + K^+)-ATPase Preparations. A Contribution to the Problem of Nonlinear Scatchard Plots. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 287-296 (1976 b)
54. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-Receptor Interactions in (Na^+ + K^+)-ATPase Preparations: From Different Tissues and Species Determination of Kinetic Constants and Dissociation Constants. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 386-398 (1973)

55. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Oubain-Receptor Interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase Preparations: IV. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335-356 (1974)
56. FINN, F.M., WIDNELL, Ch.C., and HOFMANN, K.: Localisation of an Adrenocorticotrophic Hormone Receptor on Bovine Adrenal Cortical Membranes. J. Biol. Chem. 247, 5695-5702 (1972)
57. FORGUE, M.-E., and FREYCHET, P.: Insulin Receptors in the Heart Muscle. Diabetes 24, 715-723 (1975)
58. FURCHGOTT, R.F.: The Classification of Adrenoceptors (Adrenergic Receptors). In: Catecholamines (H. Blaschko, and E. Muscholl, eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 283-335 (1972)
59. GLAUBINGER, G., SHUNG TSAI, B., LEFKOWITZ, R.J.: Chronic Guanethidine Treatment Increases Cardiac β -Adrenergic Receptors. Nature 273, 240-242 (1978)
60. GOLDBERG, L.J.: Recent Advances in the Pharmacology of Catecholamines. Intens. Care Med. 3, 233-236 (1977)
61. GOODFRIEND, T., LIN, S.-Y.: Angiotensin Receptors. Clin. Res. 17, 243-248 (1969)
62. GREENBERG, D.A., and SNYDER, S.H.: Pharmacological Properties of [^3H]-Dihydroergokryptine Binding Sites Associated with Alpha Noradrenergic Receptors in Rat Brain Membranes. Mol. Pharmacol. 14, 38-49 (1978)
63. HALL, Z.W.: Release of Neurotransmitters and their Interactions with Receptors. Ann. Rev. Biochem. 41, 925-952 (1972)
64. HANCOCK, A.A., DE LEAN, A.L., and LEFKOWITZ, R.J.: Quantitative Resolution of Beta-Adrenergic Receptor Subtypes by Selective Ligand Binding: Application of a Computerized Model Fitting Technique. Mol. Pharmacol. 16, 1-9 (1979)
65. HANSEN, O.: The Relationship between g-Strophanthin Binding Capacity and ATPase-Activity in Plasma-Membrane Fragments from Ox Brain. Biochim. Biophys. Acta 233, 122-132 (1971)
66. HARDEN, T.K., WOLFE, B.B., and MOLINOFF, P.B.: Binding of Iodinated Beta Adrenergic Antagonists to Protein Derived from Rat Heart. Mol. Pharmacol. 12, 1-15 (1976)
67. HARWOOD, J.P., LÖW, H., and RODBELL, M.: Stimulatory and Inhibitory Effects of Guanyl Nucleotides on Fat Cell Adenylate Cyclase. J. Biol. Chem. 248, 6239-6245 (1973)
68. HELMREICH, E.J.M.: Hormone Receptor Interactions. FEBS Lett. 61, 1-5 (1976)
69. HELMREICH, E.J.M., ZENNER, H.P., and PFEUFFER, T.: Signal Transfer from Hormone Receptor to Adenylate Cyclase. Current Topics in Cellular Regulation. Acad. Press 10, New York - San Francisco - London, 41-87 (1976)

70. HOLLENBERG, D.M., CUATRECASAS, P.: Membrane Receptors and Hormone Action: Recent Developments. *Progr. Neuro-Psychopharmacol.* 2, 287-302 (1978)
71. HORNUNG, R., PRESEK, P., and GLOSSMANN, H.: Alpha Adrenoceptors in Rat Brain: Direct Identification with Prazosin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 308, 223-230 (1979)
72. HOWLETT, A.C., VAN ARSDALE, P.M., and GILMAN, A.G.: Efficiency of Coupling between the Beta Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase. *Mol. Pharmacol.* 14, 531-539 (1978)
73. HYTTTEL, J.: Effects of Neuroleptics on ^3H -Haloperidol and ^3H -Cis(z)-Flupenthixol Binding and on Adenylate Cyclase Activity in Vitro. *Life Sci.* 23, 551-556 (1978)
74. INNES, I.R., and NICKERSON, M.: Drug Acting on Post-ganglionic Adrenergic Nerve Endings and Structures Innervated by them (Sympathomimetic Drugs). In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L.S., and Gilman, A., eds.), The Macmillan Co., New York, 487-523 (1970)
75. JACOBS, S., and CUATRECASAS, P.: The Mobile Receptor Hypothesis for Cell Membrane Receptor Action. *Trends in Biochem. Sci.* 280-282 (1977)
76. JOHNSON, G.L., BOURNE, H.R., GLEASON, M.K., COFFINO, Ph., INSEL, P.A., and MELMON, K.L.: Isolation and Characterization of S49 Lymphoma Cells Deficient in β -Adrenergic Receptors: Relation of Receptor Number to Activation of Adenylate Cyclase. *Mol. Pharmacol.* 15, 16-27 (1979)
77. KAISER, G., WIEMER, G., KREMER, G., DIETZ, J., and PALM, D.: Identification and Quantification of β -Adrenoceptor Sites in Red Blood Cells from Rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 305, 41-50 (1978)
78. KAPLAN, NORMAN M., M.D. (Symposium Chairman): Beta-Blocker Therapy in Cardiovascular Disease: An International Review. *Primary Cardiology Supplement*, No. 1 (1980)
79. KARLIN, A.: Molecular Interactions of the Acetylcholine Receptor. *Fed. Proc.* 32, 1847-1853 (1973)
80. KEBABIAN, J.W., and CALNE, D.B.: Multiple Receptors for Dopamine. *Nature* 277, 93-96 (1979)
81. KLEINSTEIN, J., and GLOSSMANN, H.: Solubilization of Mammalian β -Adrenergic Receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 305, 191-200 (1978)
82. KOROLKOVAS, A.: *Grundlagen der molekularen Pharmakologie*. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 7-9 (1974)
83. KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.: Specific and Unspecific Binding of $(-)^{-3}\text{H}$ -Dihydroalprenolol to Cardiac Tissue. *Biochem. Pharmacol.* 28, 1283-1288 (1979)

84. KRAWIETZ, W., POPPERT, D., ERDMANN, E., GLOSSMANN, H., STRUCK, C.J., and KONRAD, C.: β -Adrenergic Receptors in Guinea-Pig Myocardial Tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 295, 215-224 (1976)
85. KRAWIETZ, W., WEINSTEIGER, M., PRUCHNIEWSKI, M., and ERDMANN, E.: Evidence for Negative Cooperativity among β -Adrenergic Receptors in Cardiac and Lung Tissue of Guinea Pig. *Biochem. Pharmacol.* 28, 2999-3007 (1979)
86. KUNOS, G.: Adrenoceptors. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 291-311 (1978)
87. KUNOS, G., YONG, M.S., NICKERSON, M.: Transformation of Adrenergic Receptors in the Myocardium. *Nature New Biol.* 241, 119-120 (1973)
88. KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.: *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.* Thieme Verlag, Stuttgart (1978)
89. LABHART, A., ROTHLIN, M.: Beta-Rezeptorenblocker bei Hyperthyreose. *Internist (Berlin)* 19, 538-541 (1978)
90. LANDS, A.M., ARNOLD, A., MC AUCLIFF, J.P., LUDUENA, F.P., BROWN, T.G.: Differentiation of Receptor Systems Activated by Sympathomimetic Amines. *Nature* 214, 597 (1967)
91. LANGLEY, J.W.: On Nerve Endings and on Special Exitable Substances. *Proc. Roy. Soc. B* 78, 170-194 (1906)
92. LEFKOWITZ, R.J.: Molecular Pharmacology of Beta-Adrenergic Receptors - A Status Report. *Biochem. Pharmacol.* 23, 2069-2076 (1974)
93. LEFKOWITZ, R.J.: Heterogeneity of Adenylate Cyclase-Coupled β -Adrenergic Receptors. *Biochem. Pharmacol.* 24, 583-590 (1975)
94. LEFKOWITZ, R.J.: Identification of Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptors with Radiolabeled Beta-Adrenergic Antagonists. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1651-1658 (1975)
95. LEFKOWITZ, R.J.: β -Adrenergic Receptors: Recognition and Regulation. *N. Engl. J. Med.* 295, 323-328 (1976)
96. LEFKOWITZ, R.J.: Identification and Regulation of Alpha- and Betaadrenergic Receptors. *Fed. Proc.* 37, 123-129 (1978)
97. LEFKOWITZ, R.J., LIMBIRD, L.E., MUKHERJEE, Ch., and CARON, M.G.: The β -Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 257, 1-39 (1976)
98. LEFKOWITZ, R.J., MUKHERJEE, Ch., COVERSTONE, M., and CARON, M.G.: Sterospecific [^3H] (-)Alprenolol Binding Sites, β -Adrenergic Receptors and Adenylate Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 60, 703-709 (1974)
99. LEFKOWITZ, R.J., MULLIKIN, D., and CARON, M.G.: Regulation of β -Adrenergic Receptors by Guanylyl-5'-yl Imidodiphosphate and other Purine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 251, 4686-4692 (1976)

100. LEFKOWITZ, R.J., PASTAN, D., ROTH, J., PRICER, W. et al.: ACTH Receptors in the Adrenal: Specific Binding of ACTH-¹²⁵J and its Relation to Adenyl Cyclase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65, 745-752 (1970)
101. LEFKOWITZ, R.J., WILLIAMS, L.T.: Catecholamine Binding to the β -Adrenergic Receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 515-519 (1977).
102. LEFKOWITZ, R.J., WILLIAMS, L.T.: Molecular Mechanism of Activation and Desensitization of Adenylate Cyclase Coupled Beta-Adrenergic Receptors. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 1-32 (1978)
103. LESNIAK, M.A., GORDEN, P., ROTH, J., and GAVIN, J.R.: Binding of ¹²⁵J-Human Growth Hormone to Specific Receptors in Human Cultured Lymphocytes. Characterization of the Interaction and a Sensitive Radioceptor Assay. *J. Biol. Chem.* 249, 1661-1667 (1974)
104. LEVEY, G.S.: The Heart and Hyperthyroidism. *Med. Clin. North Am.* 59, 1193-1201 (1975)
105. LEVITZKI, A., ATLAS, D., and STEER, M.L.: The Binding Characteristics and Number of β -Adrenergic Receptors on the Turkey Erythrocyte. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 2773-2776 (1974)
106. LEVITZKI, A., and HELMREICH, E.J.M.: Hormone-Receptor-Adenylate Cyclase Interactions. *FEBC Letters* 101, 213-219 (1979)
107. LEVY, B.: The Selective Beta Receptor Blocking Properties of DL-1-(2-Acetyl-4-n-Butyramidophenoxy)-2-Hydroxy-3-Isopropylaminopropane HCl (M & B 17 803-A) in the Anesthetized Dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 186, 134-142 (1973)
108. LEVY, B., and AHLQUIST, R.P.: Adrenergic Drugs. In: *Drill's Pharmacology in medicine* (J.R. Di Palma, ed.), New York, Mc Graw-Hill Book Co., 463 (1965)
109. LIMAS, C.J.: Increased Number of β -Adrenergic Receptors in the Hypertrophied Myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* 588, 174-178 (1979)
110. LIMBIRD, L.E., DE MEYTS, P., LEFKOWITZ, R.J.: β -Adrenergic Receptors: Evidence for Negative Cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 64, 1160-1168 (1975)
111. LIMBIRD, L.E., LEFKOWITZ, R.J.: Negative Cooperativity among β -Adrenergic Receptors in Frog Erythrocyte Membranes. *J. Biol. Chem.* 251, 5007-5014 (1976)
112. LIMBIRD, L.E., and LEFKOWITZ, R.J.: Resolution of β -Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase Activity by Gelexclusion Chromatography. *J. Biol. Chem.* 252, 799-802 (1977)
113. LIPKIN, D., COOK, W.H., MARKHAM, R.: Adenosine-3'-5'-Phosphoric Acid: A Proof of Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 6198-6203 (1959)

114. LOH, H.H., CHO, T.M., WU, Y.C., and WAY, E.L.: Stereo-specific Binding of Narcotics to Brain Cerebrosides. *Life Sci.* 14, 2231-2245 (1974)
115. LONDOS, C., SALOMON, Y., LIN, M.C., HARWOOD, J.P., SCHRAMM, M., WOLFF, J., and RODBELL, M.: 5'-Guanylimidodiphosphate: A Potent Activator of Adenylate Cyclase Systems from Eucaryotic Cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 3087-3090 (1974)
116. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
117. LUCAS, M., and BOCHAERT, J.: Use of (-)-[³H]Dihydroalprenolol to Study Beta Adrenergic Receptor-Adenylate Cyclase Coupling in C. Glioma Cells: Rate of 5'-Guanylimidodiphosphate. *Mol. Pharmacol.* 13, 314-329 (1977)
118. MÄURER, W., SCHÖMIG, A., KADEN, F.: Blut-Katecholaminspiegel unter Betablockade. In: *Beta-Blockade* (Mäurer, W., Schömig, A., Dietz, R., Lichtlen, R.P., Hrsg.). Thieme-Verlag, Stuttgart, 50-57 (1977)
119. MAGUIRE, M.E., GOLDMAN, P.H., and GILMAN, A.G.: The Reaction of ³H-Norepinephrine with Particulate Fractions of Cells Responsive to Catecholamines. *Mol. Pharmacol.* 10, 563-581 (1974)
120. MAGUIRE, M.E., ROSS, E.M., and GILMAN, A.G.: β -Adrenergic Receptor: Ligand Binding Properties and the Interaction with Adenyl Cyclase. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 8, 1-83 (1977)
121. MAGUIRE, M.E., WIKLUND, R.A., ANDERSON, J.H., and GILMAN, A.G.: Binding of ¹²⁵I-Jodohydroxybenzylpindolol to Putative β -Adrenergic Receptors of Rat Glioma Cells and other Cell Clones. *J. Biol. Chem.* 251, 1221-1231 (1976)
122. MALCHOFF, C.D., MARINETTI, G.V.: Hormone Action at the Membrane Level. VI Bindings of (-)-[³H]Dihydroalprenolol and ($\pm$)-[³H]Isoproterenol to Turkey Erythrocytes and Correlation with Adenyl Cyclase Activity. *Biochim. Biophys. Acta* 538, 541-554 (1978)
123. MAXWELL, R.A.: Adrenergic Blocking Drugs and Adrenergic Neuron Blocking Drugs. In: *Drill's Pharmacology in medicine* (J.R. Di Palma, ed.). New York, Mc Graw-Hill Book Co., 502 (1965)
124. MINNEMAN, K.P., HEGSTRAND, L.R., and MOLINOFF, P.B.: The Pharmacological Specificity of Beta-1 und Beta-2 Adrenergic Receptors in Rat Heart and Lung in Vitro. *Mol. Pharmacol.* 16, 21-33 (1979)
125. MINNEMAN, K.P., HEGSTRAND, L.R., and MOLINOFF, P.B.: Simultaneous Determination of Beta-1 und Beta-2-Adrenergic Receptors in Tissues Containing both Receptor Subtypes. *Mol. Pharmacol.* 16, 34-36 (1979)

126. MINNEMAN, K.P., and MOLINOFF, P.B.: Commentary. Classification and Quantitation of β -Adrenergic Receptor Subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 29, 1317-1323 (1980)
127. MOORE, W.V., and WOLFF, J.: Thyroid-Stimulating Hormone Binding to Beef Thyroid Membranes. Relation to Adenylate Cyclase Activity. *J. Biol. Chem.* 249, 6255-6263 (1974)
128. MORAN, N.C., and PERKINS, M.E.: Adrenergic Blockade of the Mammalian Heart by a Dichloro Analogue of Isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 124, 223-237 (1958)
129. MUKHERJEE, Ch., CARON, M.G., COVERSTONE, M., and LEFKOWITZ, R.J.: Identification of Adenylate Cyclase-Coupled β -Adrenergic Receptors in Frog Erythrocytes with (-)-[^3H]-Alprenolol. *J. Biol. Chem.* 250, 4869-4876 (1975)
130. MUKHERJEE, Ch., CARON, M.G., MULLIKIN, D., and LEFKOWITZ, R.J.: Structure-Activity Relationship of Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptors: Determination by Direct Binding Studies. *Mol. Pharmacol.* 12, 16-31 (1976)
131. MUSCHOLL, E. und RAHN, K.H.: Adrenerge α - und β -Rezeptoren und ihre spezifischen Hemmstoffe. *Klin. Wschr.*, 46. Jahrg., 3, 113-119 (1968)
132. NICKERSON, M.: The Pharmacology of Adrenergic Blockade. *Pharmacol. Rev.* 1, 27-101 (1949)
133. ORLY, J., and SCHRAMM, M.: Coupling of Catecholamine Receptor from one Cell with Adenylate Cyclase from another Cell by Cell Fusion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73, 4410-4414 (1976)
134. OWEN, D.A.A.: Histamin Receptors in the Cardiovascular System. *Gen. Pharmac.* 8, 141-156 (1977)
135. PALM, D.: Adrenerge β -Rezeptoren und β -Rezeptorenblocker, Verlag Dr. med. Straube, Erlangen (1977)
136. PASTERNAK, G.W., and SNYDER, S.H.: Opiate Receptor Binding: Enzymatic Treatments that Discriminate between Agonist and Antagonist Interactions. *Mol. Pharmacol.* 11, 478-484 (1975)
137. PFEUFFER, T.: GTP-Binding Proteins in Membranes and the Control of Adenylate Cyclase Activity. *J. Biol. Chem.* 252, 7224-7234 (1977)
138. PFEUFFER, T., and HELMREICH, H.J.M.: Activation of Pigeon Erythrocyte Membrane Adenylate Cyclase by Guanylnucleotide Analogues and Separation of a Nucleotide Binding Protein. *J. Biol. Chem.* 250, 867-876 (1975)
139. PIKE, L.J., LIMBIRD, L.E., LEFKOWITZ, R.J.: β -Adrenoceptors Determine Affinity but not Intrinsic Activity of Adenylate Cyclase Stimulants. *Nature* 280, 501-504 (1979)
140. POCHET, R., SCHMITT, H.: Re-Evaluation of the Number of Specific β -Adrenergic Receptors on Muscle Cells. *Nature* 277, 58-59 (1979)

141. POLLET, R.J., STANDAERT, M.L., and HAASE, B.A.: Insulin Binding to the Human Lymphocyte Receptor. Evaluation of the Negative Cooperativity Model. *J. Biol. Chem.* 252, 16, 5828-5834 (1977)
142. POWEL, C.E., and SLATER, J.H.: Blocking of Inhibitory Adrenergic Receptors by a Dichloro Analogue of Isoproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 122, 480-488 (1958)
143. POWEL, J.R., and BRODY, M.J.: Identification and Specific Blockade of Two Receptors for Histamine in the Cardiovascular System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 1-14 (1976)
144. RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W., and BERTHET, J.: The Relationship of Epinephrine and Glucagon to Liver Phosphorylase. IV. Effect of Epinephrine and Glucagon on the Reactivation of Phosphorylase in Liver Homogenates. *J. Biol. Chem.* 224, 463-475 (1957)
145. REIMANN, E.M., SOLAFF, M.S.: The Effect of Radioactive Contaminants on the Estimation of Binding Parameters by Scatchard Analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 533, 130-139 (1978)
146. RODBELL, M.: Regulation of Glucagon Action at its Receptors. In: *Glucagon* (Lefebvre, P.J., and Unger, R.H., eds.). Pergamon Press, Oxford (1972)
147. RODBELL, M., LIN, M.C., SALOMON, Y., LONDOS, C., HARWOOD, J.P., MARTIN, B.R., RENDELL, M., and BERMAN, M.: Role of Adenine and Guanine Nucleotides in the Activity and Response of Adenylate Cyclase Systems to Hormones: Evidence for Multisite Transition States. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 3-29 (1975)
148. ROSS, E.M., MAGUIRE, M.E., STURGILL, T.W., BILTONEN, R.L., and GILMAN, A.: Relationship between the β -Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase. *J. Biol. Chem.* 252, 5761-5775 (1977)
149. ROTH, J.: Peptide Hormone Binding to Receptors: A Review of Direct Studies in Vitro. *Metabolism* 22, 1059-1073 (1973)
150. RUGG, E.L., BARNETT, D.B., and NAHORSKI, S.R.: Co-existence of β_1 and β_2 Adrenoceptors in Mammalian Lung: Evidence from Direct Binding Studies. *Mol. Pharmacol.* 14, 996-1005 (1977)
151. SALOMON, Y., LONDOS, C., and RODBELL, M.: A Highly Sensitive Adenylate Cyclase Assay. *Anal. Biochem.* 58, 541-548 (1979)
152. SCATCHARD, G.: The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672 (1949)
153. SCHOCKEN, D.D., ROTH, G.S.: Reduced β -Adrenergic Receptor Concentrations in Aging Man. *Nature* 267, 856-858 (1977)

154. SCHOLZ, H.: Effects of Beta- and Alpha-Adrenoceptor Activators and Adrenergic Transmitter Releasing Agents on the Mechanical Activity of the Heart. In: Handbook of Experimental Pharmacology 54/I (Szekeres, ed.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 651-733 (1980)
155. SCHÜMMANN, H.J., and BRODDE, O.-E.: Demonstration of α -Adrenoceptors in the Rabbit Heart by [^3H]-Dihydroergocryptine Binding. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, 191-198 (1979)
156. SCHÜMMANN, H.J., ENDOH, M., BRODDE, O.-E.: The Time Course of the Effects of β - and α -Adrenoceptor Stimulation by Isoprenaline and Methoxamine on the Contractile Force and cAMP Level of the Isolated Rabbit Papillary Muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289, 291-302 (1975)
157. SCHÜMMANN, H.J., ENDOH, M., WAGNER, J.: Positive Inotropic Effects of Phenylephrine in Isolated Rabbit Papillary Muscle Mediated by both α - and β -Adrenoceptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, 133-148 (1974)
158. SIMON, B., RIESER, P., KATHER, H.: Adenylat-Cyclase und Dünndarmsekretion. Inn. Med. 3, 276-282 (1976)
159. SNYDER, S.H., PERT, C.B., and PASTERNAK, G.W.: In: Handbook of Psychopharmacology (L.L. Iversen, S. Iversen and S.H. Snyder, eds.). Plenum Press, New York (1975)
160. SPORN, J.R., and MOLINOFF, P.B.: β -Adrenergic Receptors in Rat Brain. J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 149-161 (1976)
161. STENE-LARSEN, G., and HELLE, K.B.: Cardiac Beta₂-Adrenoceptor in the Frog. Comp. Biochem. Physiol. 606, 165-173 (1978)
162. SUTHERLAND, E.W.: Studies of the Mechanism of Hormone Action. Science 177, 401-408 (1972)
163. SUTHERLAND, E.W., and RALL, T.W.: The Relation of Adenosine 3'5'-Monophosphate and Phosphorylase to the Actions of Catecholamines and other Hormones. Pharmacol. Rev. 12, 265-299 (1960)
164. SVOBODA, P., SVARTENGREN, J., SNOCHOWSKI, M., HOUSTEK, J., and CANNON, B.: High Number of High Affinity Binding Sites for (-)- ^3H -Dihydroalprenolol on Isolated Hamster Brown-Fat Cells. Eur. J. Biochem. 102, 203-210 (1979)
165. TESCHEMACHER, H.: Endogeneous Ligands of Opiate Receptors (Endorphins). In: Developments in Opiate Research (Herz, A., ed.). New York, Marcel Dekkel, Inc., 68-125 (1978)
166. U'PRICHARD, D.C., BYLUND, D.B., and SNYDER, S.H.: ($\pm$)-[^3H]Epinephrine and (-)-[^3H]Dihydroalprenolol Binding to β_1 - and β_2 -Noradrenergic Receptors in Brain, Heart, and Lung Membranes. J. Biol. Chem. 253, 5090-5102 (1978)

167. VATNER, D.E., and LEFKOWITZ, R.J.: [^3H] -Propranolol Binding Sites in Myocardial Membranes: Nonidentity with Beta Adrenergic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 10, 450-456 (1974)
168. VENTER, J.C.: High Efficiency Coupling Between Beta-Adrenergic Receptors and Cardiac Contractility: Direct Evidence for "Spare" Beta-Adrenergic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 16, 429-440 (1979)
169. WAGNER, E., BRODDE, O.-E.: On the Presence and Distribution of α -Adrenoceptors in the Heart of Various Mammalian Species. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 302, 239-254 (1978)
170. WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G.: An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.*, 243, 3763-3774 (1968)
171. WALTER, H.: Partition of Cells in Two-Polymer Aqueous Phases: A Method for Separating Cells and for Obtaining Information on Their Surface Properties. In: *Methods in Cell Biol.* 9, 3, 25-50 (1975)
172. WALTER, H., KROB, E.J., ASCHER, G.S., and SEAMAN, G.V.F.: Partition of Rat Liver Cells in Aqueous Dextran-Polyethylene Glycol Phase Systems. *Exper. Cell. Res.* 82, 15-26 (1973)
173. WALTER, H., TUNG, R., JACKSON, L.J., and SEAMAN, G.V.F.: The Nature of the Cell Membrane Charge Measured by Partition in Aqueous Two-Polymer Phase Systems: Differentiation of Classes of Beef Erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 565-571 (1972)
174. WEDER, H.G., SCHILDKNECHT, J., LUTZ, R.A., and KESSELRING, P.: Determination of Binding Parameters from Scatchard Plots. Theoretical and Practical Considerations. *Eur. J. Biochem.* 42, 475-481 (1974)
175. WEIDEMANN, M.J., ERDELT, H., KLINGENBERG, M.: Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria. Identification of Carrier Sites. *Eur. J. Biochem.* 16, 313-335 (1970)
176. WEINER, N., JARDETZKY, O.: A Study of Catecholamine Nucleotide Complexes by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 248, 308-318 (1964)
177. WILLIAMS, L.T., Jarett, L., and LEFKOWITZ, R.J.: Adipocyte β -Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* 251, 3096-3104 (1976)
178. WILLIAMS, L.T., and LEFKOWITZ, R.J.: Thyroid Hormone Regulation of Beta-Adrenergic Receptor Number. *Communication. J. Biol. Chem.* 252, 2787-2789 (1977)
179. WILLIAMS, L.T., and LEFKOWITZ, R.J.: Slowly Reversible Binding of Catecholamine to a Nucleotide-Sensitive State of the Beta-Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* 252, 7207-7213 (1977)

180. WILLIAMS, T.L., SNYDERMAN, R., LEFKOWITZ, R.J.: Identification of β -Adrenergic Receptors in Human Lymphocytes by (-)- ^3H -Alprenolol Binding. J. Clin. Invest. 57, 149-155 (1976)
181. WOLFE, B.B., HARDEN, T.K., and MOLINOFF, P.B.: In Vitro Study of β -Adrenergic Receptors. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17, 575-604 (1977)
182. WOLLF, J., and COOK, G.H.: Activation of Thyroid Membrane Adenylate Cyclase by Nucleotides. J. Biol. Chem. 248, 350-355 (1973)
183. WOODCOCK, E.A., and JOHNSTAN, C.J.: Changes in Tissue Alpha- and Beta-Adrenergic Receptors in Renal Hypertension in the Rat. Hypertension 2, 156-161 (1980)

LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 21. Mai 1950 in München als einzige Tochter des Schreiners Johann Weinsteiger und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Zink.

1956 - 1960 Volksschule in Unterhaching

1960 - 1966 Städt. Theodolindengymnasium in München

1966 - 1967 kaufmännische Lehre bei Siemens

1967 - 1971 Fortsetzung der Ausbildung am neusprachlichen Zweig des Städt. Theodolindengymnasiums in München

1971 Abitur

1971 - 1978 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mai 1978 Staatsexamen und Approbation als Arzt

1978 - 1979 Mitarbeit im wissenschaftlichen Labor B der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern, München: Laborleiter Priv. Doz. Dr. med. E. Erdmann

seit Februar 1979 Wissenschaftliche Assistentin an der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern, München: Direktor Professor Dr. Riecker

